

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P DE MEDICINA VETERINARIA

**Comparación de la protección contra la EIB conferida
por la vacunación vía aspersión y vía de bebida en
pollos de carne**

TESIS

para obtener el título de Médico Veterinario

AUTOR

Diana Yolanda Castellanos Chaúd

Lima – Perú

2008

RESUMEN

Se evaluó un programa de vacunación usado en nuestro medio contra la Enfermedad Infecciosa de la Bursa aplicado vía aspersión, en comparación con el mismo programa vía agua de bebida bajo condiciones de campo (crianza) y de laboratorio (desafío), para esto se formaron dos grupos, cada uno de 34 700 pollos de engorde de la línea Cobb Vantres 500, el programa de vacunación se realizó con cepas intermedias del virus y se aplicaron a los 7 y 17 días de edad; el grupo A fue vacunado vía aspersión y el grupo B vacunado vía agua de bebida, luego a los 29 días de edad se trasladaron 50 aves de cada grupo al laboratorio para ser desafiadas con una cepa estándar F52/70. Para evaluar la protección conferida por cada ruta de vacunación se evaluó, en los animales desafiados, los signos clínicos posdesafío y tanto en los animales desafiados como no desafiados el índice bursal, las lesiones microscópicas y la respuesta serológica. La población de animales desafiados vacunados vía agua de bebida mostró, en los tres días de presentación de signos clínicos, mayor cantidad de aves con depresión que la vacunada vía aspersión, sin embargo para el signo clínico de diarrea no se encontraron diferencias estadísticas entre ambos grupos en ninguno de los días evaluados. Para las variables de índice bursal, grado de lesión microscópica de la bursa y serología de las aves desafiadas y no desafiadas no existieron diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos. Los índices bursales y el grado de lesión microscópica de este órgano indican atrofia bursal para ambas vías de aplicación de la vacuna lo que demuestra similar grado de replicación del virus vacunal esto se refuerza con similares respuestas serológicas entre ambos grupos, concluyéndose que ambas vías de vacunación pueden ser indistintamente utilizadas en la vacunación contra Gumboro.

Palabras claves: Enfermedad infecciosa de la bursa, Índice bursal, vacunación vía aspersión, vacunación vía agua de bebida, atrofia bursal, signos clínicos.

SUMMARY

We evaluated a vaccination program used in our environment against the Infectious Bursal Disease applied via spray, compared with the same program via drinking water under field conditions (upbringing) and laboratory conditions (challenge), so this was formed two groups, each of 34 700 broilers of the line Vantres Cobb 500, the vaccination program was conducted with intermediate strains of the virus and have been applied to the 7 and 17 days old; group A was vaccinated via spray and group B was vaccinated via drinking water, then to the 29 days old were moved 50 birds from each group to the laboratory to be challenged with a standard strain F52/70. To assess the protection afforded by each vaccination route was evaluated, in challenged animals, the post-challenged clinical signs and both in challenged animals as not challenged animals the bursal index, microscopic injuries and serological response. The population of challenged animals vaccinated via drinking water showed, within three days of submission of clinical signs, greater number of birds with depression than vaccinated via spray, however for the clinical sign of diarrhoea found no statistical difference between the two groups in any of the evaluated days. For bursal index variable, bursal microscopic injury degree and challenged birds and not challenged birds serology there were not statistically significant differences between both groups. The bursal indexes and the bursal microscopic injury degree indicate bursal atrophy for both implementing ways of the vaccine which shows similar replication degree of the vaccine virus that is reinforced by similar serological responses between both groups. Therefore concluded that both routes of vaccination may be used in vaccination against Gumboro

Keywords: Infectious Bursal Disease, Bursal index, vaccination via spray, vaccination via drinking water, bursal atrophy, clinical signs.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Número de aves desafiadas examinadas.....	27
Cuadro 2. Número de aves no desafiadas examinadas.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de animales desafiados que presentaron depresión.....	29	Figura 2. Porcentaje de animales desafiados que presentaron diarrea.....	30
Figura 3. Índices bursales hallados en los animales no desafiados.....	31		
Figura 4. Índices bursales hallados en los animales desafiados.....	31		
Figura 5. Grado de lesión microscópica en bursa de animales no desafiados.....	32		
Figura 6. Grado de lesión microscópica en bursa de animales desafiados.....	33		
Figura 7. Serología de los animales no desafiados.....	34		
Figura 8. Serología de los animales desafiados.....	34		

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Signos clínicos de animales desafiados.....	49
Apéndice 2. Análisis estadístico de los signos clínicos mediante la prueba de Chi cuadrado para depresión – 3 días posdesafío.....	49
Apéndice 3. Análisis estadístico de los signos clínicos mediante la prueba de Chi cuadrado para depresión – 4 días posdesafío.....	50
Apéndice 4. Análisis estadístico de los signos clínicos mediante la prueba de Chi cuadrado para depresión – 5 días posdesafío.....	50
Apéndice 5. Análisis estadístico de los signos clínicos mediante la prueba de Chi cuadrado para diarrea – 3 días posdesafío.....	51
Apéndice 6. Análisis estadístico de los signos clínicos mediante la prueba de Chi cuadrado para diarrea – 4 días posdesafío.....	51
Apéndice 7. Análisis estadístico de los signos clínicos mediante la prueba de Chi cuadrado para diarrea – 5 días posdesafío.....	52
Apéndice 8. Índices bursales en los animales no desafiados.....	53
Apéndice 9. Índices bursales en los animales desafiados.....	54
Apéndice 10. Análisis estadístico de los índices bursales mediante la prueba de T de student – animales no desafiados 30 días de edad.....	54
Apéndice 11. Análisis estadístico de los índices bursales mediante la prueba de T de student – animales no desafiados 33 días de edad.....	55
Apéndice 12. Análisis estadístico de los índices bursales mediante la prueba de T de student – animales no desafiados 37 días de edad.....	55

Apéndice 13. Análisis estadístico de los índices bursales mediante la prueba de T de student – animales desafiados 3 días posdesafío.....	56
Apéndice 14. Análisis estadístico de los índices bursales mediante la prueba de T de student – animales desafiados 7 días posdesafío.....	56
Apéndice 15. Análisis estadístico de los índices bursales mediante la prueba de T de student – animales desafiados 10 días posdesafío.....	57
Apéndice 16. Lesiones histopatológicas de la bursa - animales no desafiados.....	57
Apéndice 17. Lesiones histopatológicas de la bursa - animales desafiados.....	58
Apéndice 18. Análisis estadístico de las lesiones histopatológicas mediante la prueba de KS-II - Animales no desafiados 30 días de edad.....	59
Apéndice 19. Análisis estadístico de las lesiones histopatológicas mediante la prueba de KSII - Animales no desafiados 33 días de edad.....	59
Apéndice 20. Análisis estadístico de las lesiones histopatológicas mediante la prueba de KS-II - Animales no desafiados 37 días de edad.....	59
Apéndice 21. Análisis estadístico de las lesiones histopatológicas mediante la prueba de KS-II - Animales desafiados 3 días posdesafío.....	60
Apéndice 22. Análisis estadístico de las lesiones histopatológicas mediante la prueba de KS-II - Animales desafiados 7 días posdesafío.....	60
Apéndice 23. Análisis estadístico de las lesiones histopatológicas mediante la prueba de KS-II - Animales desafiados 10 días posdesafío.....	60
Apéndice 24. Títulos de anticuerpos según la prueba de ELISA - Animales no desafiados.....	61
Apéndice 25. Títulos de anticuerpos según la prueba de ELISA - Animales desafiados....	62
Apéndice 26. Análisis estadístico de los anticuerpos según la prueba de ELISA mediante la prueba de KS-II - Animales no desafiados 30 días de edad.....	63
Apéndice 27. Análisis estadístico de los anticuerpos según la prueba de ELISA mediante la prueba de KS-II - Animales no desafiados 33 días de edad.....	63
Apéndice 28. Análisis estadístico de los anticuerpos según la prueba de ELISA mediante la prueba de KS-II - Animales no desafiados 37 días de edad.....	63
Apéndice 29. Análisis estadístico de los anticuerpos según la prueba de ELISA mediante la prueba de KS-II - Animales desafiados 3 días posdesafío.....	64

Apéndice 30. Análisis estadístico de los anticuerpos según la prueba de ELISA mediante la prueba de KS-II - Animales desafiados 7 días posdesafío.....	64
Apéndice 31. Análisis estadístico de los anticuerpos según la prueba de ELISA mediante la prueba de KS-II - Animales desafiados 10 días posdesafío.....	64
Apéndice 32. Microfotografía de la bursa, grado de lesión N°2.....	65
Apéndice 33. Microfotografía de la bursa, grado de lesión N°3.....	65
Apéndice 34. Microfotografía de la bursa, grado de lesión N°4.....	66

I. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Infecciosa de la Bursa (EIB) esta ubicada en casi todas las áreas de producción avícola del mundo. El virus de la EIB (VEIB) causa inmunosupresión al afectar la bursa, incrementando la susceptibilidad de las aves a enfermedades secundarias, lo que disminuye la productividad generando fuertes pérdidas económicas en la industria. El virus causante de esta enfermedad es resistente y sobrevive a la limpieza y desinfección rutinaria, por lo que los lotes comerciales deben estar vacunados contra esta enfermedad para prevenirla y además se debe mantener siempre una adecuada bioseguridad (Sharma, 2006).

En el Perú, el VEIB es de gran significancia en la producción de aves por su rol principalmente inmunosupresor y condicionante a infecciones secundarias. En nuestro país se ha reportado la forma clásica de la enfermedad y pruebas moleculares han demostrado la presencia de cepas variantes que probablemente estén involucradas con casos de inmunosupresión (Falcón, 1998; Jackwood, 2002).

El principal problema en la vacunación contra la EIB en campo es la desuniformidad en la aplicación de la vacuna, ya que normalmente se realiza vía agua de bebida y la administración por esta vía puede ser deficiente debido a diversos factores como la variación de la calidad de agua en granjas individuales, el consumo de agua variable por individuo, probables fallas en los distribuidores y retiros insatisfactorios del agua; además, es difícil tener más de la mitad de las aves tomando una adecuada cantidad de vacuna dentro de las dos horas de administración (Giambrone, 1986; Bernardino, 2004).

La vacunación vía aspersión viene cobrando importancia debido a su practicidad y mejora en el proceso. Cuando la vacunación vía aspersión es realizada en la edad adecuada y con las vacunas correctas y ocurren fallas probablemente signifique que el proceso de vacunación no está bajo control (Bernandino, 2004).

El principal método de prevención de la EIB en broilers, continúa siendo la vacunación, la que en nuestro medio se realiza con dos vacunas vivas entre la segunda y tercera semana de edad, es por esto que se hace necesario buscar las maneras más efectivas de administrarlas.

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo medir la protección conferida por la vacunación vía aspersión frente a la vacunación vía agua de bebida en pollos vacunados con un programa convencional de dos vacunas vivas intermedias contra la EIB.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Sistema inmune aviar

Los vertebrados, incluidos los pollos tienen en general dos tipos de defensa contra los agentes infecciosos: la respuesta innata o no específica y la respuesta adaptativa o específica. La inmunidad innata incluye las barreras físicas y químicas, para impedir la entrada de antígenos, y los componentes celulares que pueden destruirlos. Cuando la inmunidad innata no es suficiente se activa la inmunidad específica que se vale de la inmunidad humoral compuesta por la actividad de los anticuerpos y de la inmunidad celular llevada a cabo por las células T (Erf, 1997).

El sistema inmune del pollo anatómicamente esta dividido en dos partes: El sistema inmune primario, compuesto por la Bursa y el Timo que cumplen la función de regular la producción y diferenciación de linfocitos y el sistema inmune secundario constituido por el bazo, la glándula de Harder, las tonsilas cecales, el tejido linfoide asociado al intestino, el tejido linfoide asociado a las mucosas y el tejido linfoide asociado a los bronquios, en estos tejidos se produce la captación y procesamiento de antígenos (Butcher, 1993; Stewart-Brown, 1990).

2.1.1 La Bursa de Fabricio

La bursa de Fabricio es un importante órgano linfoide presente unicamente en las aves, de morfología sacular que surge desde la cloaca dorsal, en cuyo lumen sobresalen

de 12 a 15 pliegues longitudinales llenos de folículos que contienen linfocitos B (Morales, 1998). En la bursa se secreta un tripéptido conocido como bursin que tiene como función la diferenciación de las células precursoras en linfocitos B (Audhya, 1986).

La estructura básica de la bursa se conoce como folículo bursal. Los folículos bursales están rodeados por el tejido conectivo de los pliegues. La superficie de la luz de la bursa contiene dos tipos de células: las células poligonales que cubren la entrada de cada folículo y son conocidas como epitelio asociado al folículo (FAE) y las células columnares que cubren la superficie restante y son llamadas epitelio interfolicular (IFE). Cada folículo maduro consta de médula y corteza. La corteza contiene paquetes cerrados de pequeños linfocitos y se separa de la médula por una membrana basal, la superficie de la médula esta unida a esta membrana por células cuboidales. Los vasos sanguíneos se encuentran en el estroma y en poca cantidad en la corteza, la médula es avascular. Los macrófagos son escasos en toda la bursa y se observan células dendríticas en la médula. En la superficie dorsal de la bursa cerca de su unión con la cloaca (ducto bursal) se encuentran los linfocitos T (Cullen, 1982; Pope, 1996).

La bursa, sin desafíos virales, comienza su involución entre las 10-14 semanas y concluye a las 20 semanas cuando el ave alcanza su madurez sexual y la inmunocompetencia pasa a depender del sistema inmune secundario. En la atrofia bursal los folículos bursales pierden primero la corteza y luego la médula, aparecen quistes y al final se presenta fibrosis, musculatura lisa y vasos sanguíneos (Morales, 1998; Pope, 1996; Stewart-Brown 1990).

2.2 Enfermedad infecciosa de la bursa

2.2.1 Antecedentes

2.2.1.1 Definición

La enfermedad infecciosa de la bursa o Gumboro es una enfermedad viral aguda contagiosa de pollos jóvenes causada por un Avirbirnavirus, que ha sido reconocida

como una de las enfermedades económicamente más importantes en pollos (Lukert, 1995; Butcher, 1993).

Esta enfermedad se caracteriza por la destrucción de linfocitos en la bolsa de Fabricio y en menor grado en otros tejidos linfoides (Rosales, 1997). El virus causante de esta enfermedad esta presente en el ambiente en casi todas las zonas de explotación avícola y su principal efecto es la inmunosupresión que ocasiona en las poblaciones de pollos de engorde (Sharma, 1995).

2.2.1.2 Historia

En 1962 el Dr. Cosgrove describe la enfermedad infecciosa de la bursa denominándola enfermedad de Gumboro debido a que ocurrió en una pequeña población de Delaware llamada del mismo modo. Luego se demostró que la enfermedad había estado presente desde 1957. Se cree que la emergencia de un virus patogénico a las aves pudo haber resultado del uso de harina de pescado mal procesada y contaminada con el virus de la enfermedad pancreática de los peces, ya que este es un acuabirnavirus perteneciente a la misma familia que los avibirnavirus. La primera vacuna fue hecha con bursas de animales enfermos y proporcionada vía agua de bebida a las dos semanas de edad (Avellaneda, 1995; Lindahl, 2004; Dufour, 1994; Lukert, 1995). Más adelante en Missisipi y Alabama, USA se usaron cepas calientes para sobrepasar los anticuerpos maternos, pero esto trajo como consecuencia la emergencia de la enfermedad asociada a las cepas vacunales de mayor patogenicidad en granjas donde la cepa residente era más suave (Lukert, 1995).

A finales de los sesentas se logró atenuar al virus en cultivos celulares y este virus atenuado se uso como vacuna. En los setentas se descubrió el efecto severo de la enfermedad en el sistema inmune y se asocio la presencia de la EIB con la ocurrencia de la hepatitis a cuerpo de inclusión y la dermatitis gangrenosa en broilers. A mediados de esta década se usaban las cepas atenuadas como vacuna al primer día y a las dos semanas de edad, esto permitió una buena respuesta inmune. A finales de los setentas se aisló y caracterizó el serotipo 2 presente en los pavos y no se pudo demostrar que sea patogénico (Lukert, 1995).

En los ochentas se comenzó a usar vacunas oleosas en reproductoras para mantener buen nivel de anticuerpos durante el crecimiento de la descendencia. A mitad de esta década se aisló una cepa variante en Delmarva, USA, que difería antigénicamente de las cepas clásicas y patogénicamente ya que no causaban enfermedad clínica en aves de 4 a 6 semanas de edad. Estas cepas podían atacar a las aves en presencia de anticuerpos maternos y causaban inmunosupresión. Estas nuevas infecciones se controlaron cambiando las vacunas o añadiéndoles esta nueva cepa viral (Lukert, 1995).

En 1986 Hudson *et al*, describieron la estructura genómica del segmento largo de ARN del virus y las proteínas que codificaban. En el año 1987, se estableció que el serotipo 1 poseía a su vez seis subtipos y se mostraron evidencias de que las vacunas existentes hasta ese momento no ejercían protección contra estos subtipos (Vargas, 1989), en el mismo año ocurrieron en Europa serios brotes de Gumboro en líneas de engorde y ponedoras que ocasionaron mortalidades de hasta 60%, se reconoció en Bélgica y Holanda un virus de alta virulencia de Gumboro (vvIBDV), de esta zona de Europa se diseminó a los países del oeste Europeo, así como a territorios mas remotos, luego de diez años estaba presente en casi todo el mundo exceptuando América y Australia. Sin embargo a finales de los noventas se encuentra este virus en Brasil, en los alrededores de Campina en Sao Paulo. Durante 1999 y 2000 el virus se diseminó hacia el norte y oeste del Brasil y en el 2001 apareció también en el sur. Al mismo tiempo reportes clínicos indicaban que el virus estaba diseminándose por Latinoamérica incluyendo la República Dominicana. En este mismo año se reportó este virus en Venezuela (Avellaneda, 1995; Di Fabio, 1999; Piña, 2003).

2.2.1.3 Importancia económica

La infección bursal ha sido reconocida como una de las enfermedades económicamente más importantes en pollos desde 1960 debido a la enfermedad clínica y a la mortalidad en pollos de tres a más semanas de edad y más importante aún a la inmunosupresión prolongada que causa en pollos infectados a una edad temprana (Lukert, 1994; Saif, 2003).

El sistema inmune afectado está en menor capacidad de defenderse contra los desafíos y es más probable que el ave sufra de cualquiera de las infecciones secundarias tales como dermatitis gangrenosa, enfermedad de Marek o coccidiosis. Las parvadas que han tenido un problema con este virus usualmente tendrán menor peso, poca uniformidad y mayor mortalidad (Avellaneda, 1995; Lucio, 1995). Las cepas clásicas pueden causar mortalidades de hasta 5% en poblaciones susceptibles. Como resultado de la inmunosupresión se afectan negativamente la tasa de crecimiento y la productividad ya que los animales se vuelven susceptibles a otros virus, bacterias y parásitos. La emergencia de cepas altamente patogénicas ha causado grandes pérdidas en pollos de engorde y pollitas para postura y reproducción en Europa, Asia y África. En Europa, se ha demostrado un índice de 90% de morbilidad y 20% de mortalidad en gallinas Leghorn de 3 a 8 semanas de edad y de 50% de morbilidad y más del 3% de mortalidad en pollos de carne de 3-6 semanas de edad. La emergencia de cepas de alta virulencia incrementó la importancia de la inmunosupresión que causa el virus, ya que los lotes de gallinas y de broilers afectados reducen la respuesta a la vacunación contra virus respiratorios como Newcastle o Bronquitis infecciosa y manifiestan mayores reacciones posvacunales (Lasher, 1994).

2.2.2 Etiología

2.2.2.1 Agente etiológico

El virus de la enfermedad infecciosa de la bursa o virus de la enfermedad de Gumboro, ha sido clasificado dentro de la familia *Birnaviridae*. Esta familia se creó para clasificar virus de doble cadena de ARN que sólo tienen dos segmentos y diferenciarlos de los Reovirus, que tienen de diez a veinte segmentos. La familia *Birnaviridae* se divide en los géneros *Aquabirnavirus*, *Entombirnavirus* y en el género *Avibirnavirus* donde se encuentra el VEIB (Carter, 2005).

Antes del reconocimiento de la familia *Birnaviridae*, y de que hubiera información adecuada acerca de sus características morfológicas y fisicoquímicas, el Virus de la

Enfermedad Infecciosa de la Bursa se colocaba en ocasiones en las familias *Picornaviridae* o *Reoviridae* (Lukert, 1995).

2.2.2.2 Características morfológicas

El VEIB es un virión no envuelto con una cubierta simple de simetría icosaédrica, y un diámetro de 55-65 nm (Lukert, 1995). Consta de 132 capsómeros y no tiene proyecciones en su superficie. Su densidad flotante en cloruro de cesio es de 1.33 g/cm³ (ICTBdb, 2006), el genoma consta de dos segmentos de ARN de doble cadena, el A y el B, que representan el 9.7% del peso del virión (Muller, 1982; Carter, 2005), por lo que pertenece a la clase III de la clasificación viral de Baltimore (Aranda, 1995).

El segmento A, que es el más grande consta de 3100 a 3200 nucleótidos (ICTBdb, 2006) y codifica la poliproteína precursora que, una vez introducida, es fragmentada en los polipéptidos VP2, VP3 y VP4 (Hudson, 1986), y la poliproteína recientemente descrita, la VP5. (Mundt, 1995). El B tiene de 2750 a 2850 nucleótidos (ICTBdb, 2006) y codifica el polipéptido VP1 que es la polimerasa viral (Hudson, 1986). La proteína VP2 que constituye la cápside y representa el 50 % de la proteína viral, induce la formación de anticuerpos ya que contiene al menos tres epitopes protectores dependientes de la conformación, responsables de la inducción de anticuerpos, por lo que cambios en su región hipervariable pueden causar variaciones en las propiedades antigénicas y patogénicas del virus, (Banda, 2002a, Dormitorio, 1997; Lasher, 1994; Lucio, 1995). La VP3 que comprende el 40% de la proteína de la cápside, contiene los antígenos específicos de grupo y su terminal C esta implicada en estabilizar el ARN en el interior de la misma (Malliga, 1997; Lasher, 1994). La VP4 es una proteasa que libera los extremos N y C de la poliproteína precursora liberándose y liberando también la proteína precursora de la VP2 (pVP2) y la proteína VP3. La pVP2 luego de cortes seriados en su Terminal C produce la proteína VP2 madura y cuatro péptidos que siguen asociados al virión, estos péptidos parecen tener la función de desestabilizar la membrana celular para la entrada del virus (Coulibaly, 2005). La VP5 es una proteína no estructural que ha demostrado tener efecto citolítico en la célula del hospedador,

alterando la membrana plasmática favoreciendo la salida de la progenie viral (Lombardo, 2000).

2.2.2.3 Resistencia del virus

El virus de la enfermedad infecciosa de la bursa es uno de los virus aviares más resistentes a condiciones adversas (Cardozo, 2004), se ha demostrado que este virus se inactiva a pH 12 y que soporta ácidos de hasta pH 2, resiste el tratamiento con éter, cloroformo, fenol y timerosol, puede ser afectado por la formalina al 0.5% y complejos de yodo (Benton, 1967). Este virus se ha logrado inactivar exponiéndolo a cloramina al 0.5% por diez minutos y a detergentes invertidos con 0.05% de hidróxido de sodio (Landgraf, 1967). Es altamente resistente a la exposición ambiental por que es refractario a la luz ultravioleta lo que contribuye a su permanencia en las instalaciones (Lasher, 1994). Mandeville *et al* en el año 2000 demostraron que a partir de 65 °C por más de un minuto se comienza a inactivar al 90% de los virus, requiriendo seis minutos para completar la inactivación. Debido a la resistencia de este virus, lo podemos encontrar en las instalaciones hasta cuatro meses después de un brote (Butcher, 1993).

2.2.2.4 Clasificación del VEIB

Dentro de los Avibirnavirus se han identificado dos serotipos. El serotipo 1 que es el serotipo clásico del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa y que afecta principalmente a los pollos y el serotipo 2 que fue aislado y caracterizado a finales de los setentas de pavos infectados, ambos serotipos tienen un antígeno común (Avellaneda, 1995; Lukert, 1995; Montassier, 2001; Lucio, 1995). Todas las cepas patogénicas del virus pertenecen al serotipo 1, por lo que todas las vacunas están fabricadas a partir de virus de éste. Existen dos grupos antigénicos mayores dentro del serotipo 1 designados como virus clásicos y virus variantes. Estos virus se pueden diferenciar mediante la prueba de virus neutralización (Saif, 1999; Cardozo, 2004).

En cuanto a la patogenicidad se clasifican como virus suaves, intermedios, virulentos y muy virulentos (Cardozo, 2004).

2.2.3 Epidemiología

2.2.3.1 Distribución

Las infecciones con el serotipo 1 del la EIB tienen distribución mundial y se presentan en todas las áreas importantes de producción avícola. La incidencia de infección en estas zonas es elevada; prácticamente todas las parvadas en las etapas iniciales de vida están expuestas al virus. A causa de las vacunaciones efectuadas por la mayoría de productores, todos los pollos finalmente se vuelven seropositivos a la EIB. No obstante los casos clínicos son poco comunes, ya que las infecciones se modifican por los anticuerpos maternos o se originan con virus de cepas variantes que no ocasionan enfermedad clínica pero que pueden inducir grave inmunosupresión. Las cepas altamente virulentas causan graves brotes con alta mortalidad en varias partes del mundo (Lukert, 1994). La mayoría de los países miembros de la OIE se reportan positivos a la enfermedad el año 2004, incluyendo al Perú (OIE, 2007).

2.2.3.2 Transmisión

El VEIB es altamente contagioso y la enfermedad es propagada por contacto directo entre aves infectadas y susceptibles. Los animales infectados pueden esparcir el virus un día después de la infección y trasmitirla hasta después de catorce a dieciséis días. Los pollos infectados pasan el virus por sus heces, contaminando el agua, el alimento y la cama. Los animales susceptibles se infectan al ingerir al virus, este penetra generalmente por vía oral pero el aparato respiratorio superior y la conjuntiva juegan probablemente un papel importante. El escarabajo de la cama *Alphitobius diaperinus* puede trasportar mecánicamente al virus. El VEIB, debido a su resistencia natural, también se puede trasmitir de manera mecánica de granja a granja por personas, equipos y vehículos. Instalaciones con múltiples edades, los defectos en la bioseguridad o la

proximidad a vehículos de transporte de aves, podrían contribuir a una alta prevalencia de la infección. No se ha demostrado que esta enfermedad se pueda transmitir de manera vertical. (Butcher, 1993; Avellaneda, 1995; Lasher, 1994).

2.2.4 Patogenia

El periodo de incubación de esta enfermedad es de dos a tres días. La célula blanco del VEIB son los linfocitos B con Ig M de membrana, que son las células adultas responsables directas del reconocimiento de antígenos y de la generación de la respuesta humoral. Luego del ingreso del virus éste se replica en las células linfoides del tracto gastrointestinal, se ha encontrado por inmunofluorescencia antígeno viral en macrófagos y células linfoides cuatro horas después de la inoculación. Luego de una hora más estos virus llegan al hígado para luego llegar al sistema sanguíneo donde se distribuyen hacia otros tejidos, alcanzando así la bursa donde se da la segunda viremia masiva, esta replicación viral provoca una grande destrucción de las células linfoides de la corteza y médula de la bursa, luego de esto el virus se distribuye a otros órganos linfoides. La bursa constituye un sitio primario para la replicación viral, pero se puede encontrar virus en otros órganos linfoides como el timo, las tonsilas cecales, el bazo y la glándula de Harder (Lukert, 2003; Lindahl, 2004; Montassier, 2001).

El virus de Gumboro al dañar la bursa evita la programación de suficientes cantidades de linfocitos, por lo que los pollos expresan una capacidad reducida del sistema inmune (Butcher, 1993).

Lonneke *et al* en 1997 encontraron que en pollos infectados con el VEIB los macrófagos mononucleares de la bursa aumentan en cantidad, y también los linfocitos T del timo. Luego In Jeong *et al* en el 2000 descubren que la replicación viral fue acompañada de infiltración de linfocitos T en la bursa, llegando a ser el 65% de las células linfoides en este órgano, al eliminar estas células se observó incremento de la carga viral lo que demostraría que la migración de estas células T puede promover la recuperación de la infección (In-Jeong, 2000; Lonneke, 1997).

Se ha demostrado que la bursa de Fabricio no es un órgano necesario para la infección pero si para la enfermedad, ya que pollos bursectomizados y luego infectados no mostraron signos de la enfermedad y sólo se encontró discreta necrosis en órganos linfoides, estos animales mostraron al virus infectante y también anticuerpos específicos. Esto demostraría la importancia de la presencia de células susceptibles en la EIB. (Kaufer, 1980).

Se ha descubierto el rol de la VP5 en la lisis de la célula hospedera para la salida de la progenie viral. Al destruirse los linfocitos B IgM disminuye la respuesta inmune primaria, sin embargo, la respuesta inmune secundaria continua normal (Lombardo, 2000).

En cuanto a la respuesta inmune celular, estudios in Vitro han demostrado que las células T de bazo y sangre periférica de aves infectadas disminuyen su respuesta mitogénica los primeros días de la infección, esta disminución es mediada por macrófagos, y se ha planteado que los linfocitos T de la bursa producen interferón gama y al actuar este sobre los macrófagos ocasiona la producción de altas cantidades de oxido nítrico lo que interfiere en la proliferación de las células T del bazo (Lombardo, 2000).

2.2.5 Signos clínicos y Formas de presentación

Los signos de la enfermedad con una cepa clásica se manifiestan en aves mayores de tres semanas de 2 a 3 días después de la exposición, Cosgrove (1962) en el primer reporte de la enfermedad, describió plumas sucias en la cloaca, diarrea blanquecina o acuosa, anorexia, depresión, plumas erizadas, temblores, postración intensa y finalmente muerte. Las aves afectadas se deshidratan y en las etapas terminales de la enfermedad tienen temperatura subnormal (Lukert, 2003). Puede disminuir el consumo de alimento, y se eleva el consumo de agua. Los lotes afectados muestran depresión por 5 a 7 días y la mortalidad aumenta rápidamente los dos primeros días y luego va declinando hasta que vuelve la normalidad clínica (Lasher, 1994). Los pollos afectados

muestran inmunosupresión transitoria. Las manifestaciones gastroentéricas se deben a la entrada del virus en el sistema GALT, causando alteraciones funcionales, resultando en enteropatías como diarrea e inmunodeficiencia local, por lo que el ave entra en un cuadro de deshidratación y desequilibrio electrolítico. Después de la fase aguda, la mortalidad regresa a la normalidad y el desempeño del lote puede ser recuperado dependiendo de la asociación con otras enfermedades (Butcher, 1993).

Las cepas muy virulentas causan signos clínicos similares que las cepas más suaves pero con una alta morbilidad de hasta 80% y mortalidades de hasta 25% en pollos de carne. Además los signos son exacerbados y el período de incubación parece ser menor de 60 a 72 horas, indicando una replicación viral más rápida (van den Berg, 2001).

La infección subclínica en animales menores de tres semanas, no manifiesta signos clínicos pero si una inmunosupresión grave y permanente, al igual que con las cepas variantes que manifiestan también marcada inmunosupresión, los animales afectados reducen el consumo de alimento y la tasa de crecimiento, muestran palidez y ligero decaimiento (Lasher, 1994; Ruocco, 2001).

2.2.6 Lesiones

2.2.6.1 Lesiones macroscópicas

Los pollos afectados con la forma clínica de la EIB muestran deshidratación de la fascia subcutánea y de los músculos pectorales, a veces pueden mostrar hemorragias equimóticas en la región inguinal y ocasionalmente en el área pectoral. Se puede también observar hemorragia en la mucosa del proventrículo. Es posible que la hemorragia esté presente debido a que el virus de la EIB interfiere con el mecanismo normal de coagulación de la sangre. Los riñones pueden estar hinchados y se puede observar uratos como manchas blancas debajo de la cápsula en animales que mueren o en los que son sacrificados con etapas avanzadas de la enfermedad. Se conoce que el VEIB causa daño a la bursa de Fabricio, dependiendo del tipo de virus y la etapa de la

infección, la bolsa puede aumentar de tamaño hasta el doble de lo normal o atrofiarse a un cuarto de su tamaño. Los animales sacrificados a los cuatro días posinfección generalmente muestran la bursa edematosa e hiperémica y del doble de su tamaño, con una resudación amarilla y gelatinosa que cubre la superficie. Al corte, la bursa se aprecia hiperémica o hemorrágica. A los cinco días posinfección el órgano disminuye y a los ocho días puede estar a un tercio de su tamaño normal. (Lasher, 1994; Butcher, 1993; Stewart-Brown, 1990).

En la necropsia el timo aparece más pequeño de lo normal entre los tres a siete días posinfección, esta atrofia es menos notoria que la de la bursa y muchas veces es temporal y puede pasar desapercibida (Stewart-Brown, 1990).

La EIB produce atrofia bursal y tímica evidenciada por la disminución del peso relativo de ambos órganos y disminución del diámetro de la bursa. Así mismo, produce esplenomegalia, que junto con la atrofia bursal, disminuyen la relación de diámetros bursa/bazo (Talavera, 1994).

Las cepas variantes, no causan la fase aguda, pero la infección resulta en una rápida y profunda atrofia de la bursa (Lasher, 1994). Las cepas muy virulentas comparadas con cepas moderadamente patógenas ocasionaron mayor disminución en el índice del peso del timo y lesiones más graves en las tonsilas cecales, timo, bazo y médula ósea pero las lesiones de la bursa resultan similares (Lukert, 2003).

2.2.6.2 Lesiones microscópicas

Las lesiones histopatológicas de la EIB se producen principalmente en las estructuras linfoides, como la bursa, bazo, timo, glándula de Harder, tonsilas cecales, GALT y presumiblemente en el HALT. Las alteraciones más intensas se dan en la bursa, en la que la infección con una cepa estándar produce necrosis de las células B y una respuesta inflamatoria acompañada de edema, congestión y/o hemorragia, infiltración

de heterófilos, restos picnóticos y células retículo endoteliales hiperplásicas, a excepción del VEIB variante que no produce inflamación. Dentro de las 24 a 36 horas posinfección se aprecia necrosis de linfocitos en el área medular de los folículos bursales asociada con cariorrexis y picnosis, proliferación de macrófagos, células plasmáticas y heterófilos. A las 48 horas pueden no observarse linfocitos. La destrucción de estos es seguida por edema alrededor de los folículos y en algunos casos hemorragia. Luego el centro de los folículos se encuentra totalmente necrótico con cavidades quísticas, se aprecia fibroplasia en el tejido conjuntivo interfolicular y el epitelio de cubierta se torna irregular. El edema de la bursa coincide con el aumento de tamaño tres a cinco días posinfección. Entre los ocho a doce días se observa disminuida de tamaño de un cuarto a un octavo de su tamaño normal. La repoblación de la bursa con linfocitos ocurre a los 71 días posinfección. Esta regeneración se caracteriza por la irregularidad de los folículos. En casos severos se afectan todos los folículos al mismo tiempo, y con las cepas más suaves se afectan los folículos superficiales (Pope, 1996; Lukert, 2003).

En las etapas iniciales de la infección el bazo presenta hiperplasia de células reticuloendoteliales alrededor de las vainas adenoides en las arterias. Hacia el tercer día se observa necrosis linfoide en los folículos germinales y en las vainas linfoides periarteriolares. El bazo se recuperará de la infección rápidamente, sin daño sostenido en los folículos germinales. El timo y las tonsilas cecales exhiben cierta reacción celular en los tejidos linfoides en las etapas tempranas de infección, pero el daño es menos extenso que en la bursa y la recuperación es más rápida. La glándula de Harder se ve afectada disminuyendo considerablemente el número de células plasmáticas, sin embargo, se llega a recuperar a los catorce días posinfección (Lukert, 2003).

Al comparar los órganos linfoides de aves de un día de edad infectadas con una cepa muy virulenta de Gumboro con aves de tres semanas, ambos grupos presentaron en la bursa disminución de linfocitos B y aumento de linfocitos T hasta el quinto día posinfección. Los cambios leucocíticos en el bazo, el timo y la glándula de Harder fueron también similares y se recuperaron a partir del día ocho posinfección (Lonneke, 1997). En la glándula de Harder se observa necrosis de las células plasmáticas e

infiltración heterófila lo que indica compromiso de la respuesta inmune en la región paraocular y del tracto respiratorio alto (Dohms, 1988).

2.2.7 Diagnóstico

Para diagnosticar la EIB se deben tener en cuenta la historia de la parvada, las lesiones macro y microscópicas y los signos clínicos. El inicio rápido, morbilidad elevada, mortalidad en espiga y la rápida recuperación de los signos clínicos son característicos de esta enfermedad. La confirmación del diagnóstico se hace durante la necropsia al examinar la bursa. Debe considerarse que hay alteraciones distintivas en tamaño y color bursal, es decir el crecimiento seguido por atrofia. Durante las etapas posteriores de la enfermedad es muy difícil confirmar una diagnosis solo examinando la bursa atrofiada, dado que otras enfermedades pueden producir los mismos signos (Enfermedad de Marek, micotoxicosis). En animales menores de tres semanas las infecciones con VEIB clásicos y variantes son subclínicas, por lo que el diagnóstico se debe complementar con histopatología, serología o aislamiento viral (Butcher, 1993; Lukert, 2003).

2.2.7.1 Pruebas serológicas

Luego de las observaciones de campo, para realizar un análisis más amplio se pueden recolectar sueros de las aves para realizar pruebas serológicas. Se puede usar un monitoreo serológico para evaluar la eficiencia de los programas de vacunación, para complementar el diagnóstico se debe trazar un perfil inmunológico del plantel o determinar el nivel de anticuerpos de las reproductoras o el traspaso de estos a la progenie. Es muy importante saber evaluar los resultados de las pruebas serológicas ya que no existe un patrón para su lectura y se deben tener en cuenta muchos aspectos de campo. En la fase de convalecencia podemos detectar inmunoglobulina G, esta etapa es de mayor duración que la fase aguda, en la que se detecta inmunoglobulina M. Una buena prueba serológica debe ser rápida, sensible y específica, precisa, exacta, práctica

y de bajo costo. Las pruebas serológicas más usadas para la enfermedad de Gumboro, son la de agar gel precipitación, la prueba de seroneutralización y la prueba de ELISA (Avellaneda, 1995; Lukert, 2003).

La prueba de agar gel precipitación es una prueba de antígeno anticuerpo cuyo complejo se visualiza en un medio semi sólido a través de una línea de precipitación. Es una técnica rápida y barata, que detecta Ig M e Ig G a partir de los 7 a 10 días posinfección. Es una prueba cualitativa o semi cuantitativa que sirve para detectar anticuerpos o antígenos de la EIB. Es altamente específica pero de baja sensibilidad, necesitando altas cantidades de muestra para reaccionar positivamente, fue muy usada en Europa antes del advenimiento de la prueba de ELISA. Con esta prueba se considera un lote positivo cuando por lo menos 30% de las muestras son positivas (Di Fabio, 1999).

La seroneutralización consiste en una mezcla de virus conocido con suero sospechoso diluido. Es una prueba cuantitativa sensible y específica que detecta IgM e IgG. La variedad antigénica de esta enfermedad dificulta la lectura de esta prueba. Esta es sin embargo, la única prueba serológica que detectará los diferentes serotipos del virus y sigue siendo el método preferido para discernir variaciones antigénicas entre aislamientos de este virus (Lasher 1994; Lukert, 2003; Di Fabio, 1999).

La prueba de ELISA es la más usada actualmente para la evaluación de anticuerpos, es rápida, sensible, específica y los resultados se pueden ingresar fácilmente a programas de computación. La utilización de esta prueba como un sistema de chequeo de parvadas, es el método más efectivo, ya que permite hacer un seguimiento de títulos y detectar anomalías en la curva de anticuerpos. Esta prueba usa un virus clásico o más actualmente proteínas virales antigénicas adheridas a los orificios de la placa, donde se añadirá el suero problema, si éste contiene anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Gumboro, se fijará al antígeno (Banda, 2002; Salas, 2002; Lukert, 2003; Di Fabio, 1999; Odor, 1995).

Existen diversas pruebas de ELISA, las desarrolladas en los últimos tiempos usan las proteínas virales o partes de ellas, y han demostrado mayor detección de anticuerpos que las pruebas de ELISA estándar, además de demostrar mayor correlación con la protección contra cepas clásicas y variantes (Salas, 2002).

2.2.7.2 Pruebas moleculares

Existen también pruebas moleculares que son usadas en la investigación para identificar las cepas y mejorar las vacunas existentes, estas pruebas no son usadas comúnmente en las granjas ya que son más caras y complicadas, sin embargo son muy específicas y sensibles. Se ha logrado la identificación de las cepas a través de pruebas post-RT-PCR, como la prueba de restricción enzimática RFLP y la FRET (fluorescence resonance energy transfer) (Jackwood, 1999).

2.2.7.3 Evaluación de órganos linfoides

Las aves que mueren o son sacrificadas luego de 4 días de la infección muestran la bursa túrgida, edematosa y a veces hemorrágica, luego 5 días se inicia la atrofia, pudiendo observarse a los 7-10 días que tiene 1/3 de su tamaño original (van den Berg, 2001; Lasher, 1994). Para evaluar de forma más objetiva se hace uso del índice bursal que es la medida de proporción del peso de la bursa con el peso del ave; en aves sin desafío se ha observado un aumento sostenido del índice bursal desde los 7 hasta los 28 días de edad y una disminución a los 35-42 días (Huapaya, 1994). Sin embargo, el estudio macroscópico tiene limitaciones ya que muchas de las bursas más grandes y más pesadas no son las mejores, sino las más afectadas, ello por que la congestión, el edema y el exudado inflamatorio incrementan el peso bursal, además, durante el curso de la enfermedad se producen cambios histológicos distintivos en la bursa, identificados por su tamaño y coloración, por lo tanto la evaluación debe completarse con el estudio microscópico que se realiza utilizando una delgada muestra de la bursa incrustada en parafina para examinarla microscópicamente y determinar el grado de atrofia y lesión en el órgano (Morales, 1998; Babaahmady, 2005).

2.2.8 Prevención y Control

No existe un programa de vacunación universal o infalible contra esta enfermedad es por eso que el control depende de la planeación e implementación de un programa integral de bioseguridad, vacunación y diagnóstico serológico (Rosales, 1993).

Para mantener a las granjas libres de la EIB es importante aplicar un completo procedimiento de bioseguridad que apoye al un adecuado y bien administrado programa de vacunación de los reproductores y de la progenie. Aves vacunadas pueden enfermar o pasar por cuadros inmunosupresivos cuando la carga viral es elevada o cuando el virus de campo es más patógeno que la cepa vacunal, además, otros agentes inmunosupresores pueden exacerbar la enfermedad (Lasher, 1994). El control eficaz permite reducir la exposición al virus de campo por medio de la limpieza y desinfección entre campañas y por el control del tráfico en la granja. Los esfuerzos en bioseguridad se deben aplicar en forma continua pues las mejorías se dan en forma gradual y muchas veces se ven mejoras después de tres o cuatro parvadas (Butcher, 1993).

2.2.8.1 Vacunación

La inmunización es un problema complejo en los animales de producción, ya que se deben tratar grandes grupos de aves como una unidad. En el caso de la EIB es especialmente difícil debido a la gran diversidad antigénica entre las cepas del virus, a la patogenicidad variable de los virus que ocupan la granja, al variable nivel de exposición relacionado al manejo, a la sanidad, al nivel y uniformidad de los anticuerpos maternos (Avellaneda, 1995; Rosales, 1993; Lukert, 2003).

La protección contra la EIB es mayormente dependiente de una respuesta humoral, entonces el nivel de anticuerpos en los lotes es un buen indicador del nivel de protección (Saif, 2003).

2.2.8.1.1 Vacunas inactivadas

Las vacunas inactivadas se emplean para reforzar y prolongar la inmunidad en parvadas de reproductoras, contienen cepas clásicas y pueden contener variantes, pero no son prácticas, ni convenientes para inducir una respuesta primaria en pollos jóvenes (Saif, 2003; Lukert, 2003). La vacunación de reproductoras es importante ya que permite transmitir inmunidad de los progenitores hacia su progenie. Como regla general del 50 al 60% de la media geométrica de los anticuerpos presentes en las madres pueden ser transferidos a la progenie. Los anticuerpos maternos protegerán al pollo de infecciones tempranas normalmente entre una a tres semanas, pero mediante el refuerzo de la inmunidad en reproductoras con vacunas inactivadas con adyuvante oleoso la protección se puede extender a cuatro o cinco semanas (Lukert, 2003; Rosales, 1993; Avellaneda, 1995; Tizard, 1995; van den Berg, 1991). Se ha demostrado que pollos con altos niveles de anticuerpos maternos obtienen mejor protección que animales con niveles intermedios o nulos (Al Natour, 2004). Las vacunas inactivadas son capaces de inducir niveles altos de anticuerpos maternos en la progenie (Avellaneda, 1995; Lasher, 1994). No existe un programa generalizado a seguir en reproductoras, sin embargo, un patrón general es aplicar dos vacunas intermedias en las primeras semanas de vida, por ejemplo a las dos y las seis semanas y aplicar la primera vacuna inactivada oleosa alrededor del comienzo de la producción cerca de la semana veinte y la segunda alrededor de la semana cuarenta. Estas vacunaciones deben ir de la mano con el monitoreo del título de anticuerpos en la progenie al primer día de edad y de las reproductoras durante las primeras 10-20 semanas de producción (Giambrone, 1982; Montassier, 2001; McMurray, 1995). El tiempo de vida media de los anticuerpos maternos en pollos de carne es de 3.5 días, y en líneas de ponedoras es de hasta 6 días (Avellaneda, 1995).

2.2.8.1.2 Vacunas atenuadas

Las vacunas vivas se utilizan en lotes comerciales, las más comúnmente usadas contienen cepas clásicas. Las vacunas clásicas pueden ser suaves, intermedias y

calientes. El virus de la vacuna se replica en bursa, timo y bazo donde permanece por dos semanas, una vez que se catabolizan los anticuerpos maternos hay una respuesta de anticuerpos primaria al virus de vacuna persistente. Los virus de vacunas que son atenuados ligeramente inducen lesiones bursales y afectan el sistema inmune. La vacunación en los pollos de carne es importante ya que los anticuerpos maternos en estos pueden no ser uniformes y protegen entre 1 a 4 semanas (Avellaneda, 1995; Saif, 2003; Lukert, 2003).

En el año 1970 se comenzaron a usar vacunas atenuadas y avirulentas pero no sobrepasaban a los anticuerpos maternos por lo que se elaboraron las vacunas intermedias que sí los excedían. Con la introducción de las cepas variantes y las hipervirulentas se fueron creando nuevas cepas vacunales para afrontar las diferentes situaciones de cada región. Las cepas más virulentas inducen altos y rápidos niveles de anticuerpos pero también pueden inducir reacciones negativas como la inmunosupresión. Las cepas vacunales más usadas actualmente son las intermedias, las vacunas de alta virulencia no son usadas (Lasher, 1994).

El principal inconveniente con las vacunas vivas en pollos con anticuerpos maternos es que la replicación del virus puede ser obstaculizada y no ocurrir la respuesta inmune a la vacuna, además, que no todos los animales tienen el mismo nivel de anticuerpos, por lo que se recomienda aplicar nuevamente la vacuna cuando los anticuerpos maternos están declinando (Avellaneda, 1995, Lukert, 2003) el momento adecuado para la vacunación con cepas atenuadas e intermedias varía entre los 7 días a los 14 ó 21 días de edad, sin embargo, no se puede ofrecer un programa de vacunación universal debido a la variabilidad de la inmunidad materna, tratamiento y condiciones operacionales (Lukert, 2003).

La herramienta utilizada para dilucidar este problema son las fórmulas para calcular la edad óptima de vacunación, sin embargo se deben tener en cuenta las particularidades de cada explotación, algunos productores vacunan al día de edad y luego a los 14 días, otro programa usado comúnmente es vacunar a los 9 días y luego a los 19 días (de Wit, 2002; Butcher, 1993).

2.2.8.1.2.1 Vías de aplicación

Existen diferentes maneras de aplicar las vacunas vivas como la vía oral en el agua de bebida, vía aspersión, vía nasal y vía ocular (Lindahl, 2004). La vía de aplicación de la vacuna de la EIB más usada es vía agua de bebida por ser económica y rápida, sin embargo, se han realizado investigaciones aplicando la vacuna vía aspersión ya que la administración por agua de bebida puede ser deficiente debido a diversos factores como la variación de la calidad de agua en granjas individuales, el consumo de agua variable por individuo, probables fallas en los distribuidores y retiros insatisfactorios del agua, además, bajo la mayoría de los casos es difícil tener más de 50% de las aves tomando una adecuada cantidad de vacuna dentro de las dos horas de administración, lo que genera dosis desuniformes de vacuna y vacunación incompleta del lote (Giambrone, 1986; Bernardino, 2004). Es importante también señalar que la falta de agua, aun por periodos cortos, causa mucha tensión y puede ser mortal en pollos de carne por periodos más prolongados (Russell, 1992). En la aspersión por gota gruesa se puede administrar la vacuna satisfactoriamente a un mínimo de 70 a 80 % de aves (Giambrone, 1986).

2.2.8.1.2.1.1 Vacunación vía aspersión

La vacunación en aspersión esta ganando importancia en los últimos años debido a su practicidad, facilidad de aplicación y a la uniformidad encontrada en la aplicación (Giambrone, 1986; Bernardino, 2004).

La vacunación vía aspersión estimula las mucosas conjuntivas sensibiliza la glándula de Harder, y distribuye el antígeno viral de la cavidad nasal a la cavidad oral (cuando se usan gotas gruesas) induciendo una sólida respuesta inmunológica (Bernardino, 2004).

Para vacunar contra gumboro vía aspersión se recomienda usar aspersores de gotas gruesas. Se ha demostrado que partículas grandes mayores a 100 μm producen una mejor inmunidad que aquellas de 45 a 50 μm (Vargas, 1989). En el año 2005 Banda *et al* evaluaron el nivel de protección conferido por una cepa intermedia de virus vacunal de Gumboro vía aspersión y vía agua de bebida concluyendo que al primer día de edad no existieron diferencias, a los 10 días la vacunación en aspersión produjo mejor

protección, y aplicadas en el mismo grupo de aves al día y diez días de edad no se encontraron diferencias significativas entre ambos métodos. En el mismo año, Purvis, Villegas y Banda realizan una investigación vacunando contra Gumboro pollos de carne con dos métodos de vacunación por aspersión con gota gruesa, encontrando adecuados niveles de protección en ambos casos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Lugar de estudio:

La crianza se realizó en las instalaciones de una empresa privada en la provincia de Huaral, departamento de Lima.

El desafío experimental, las necropsias y las pruebas serológicas se realizaron en los ambientes del laboratorio de Patología aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

El estudio histopatológico en el laboratorio de Histopatología, Embriología y Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.1.2 Animales

Se usaron 69 100 pollos broilers de la línea Cobb vantes 500 provenientes de gallinas adultas, 36 700 hembras y 32 400 machos.

3.1.3 Condiciones de crianza

Los pollos fueron distribuidos en cuatro galpones de 150 m de largo x 12 m de ancho, con techos de arpiller y pisos de arena. Se usó una densidad poblacional de 10 hembras y 9 machos por metro cuadrado. Se utilizó cama nueva de cascarilla de arroz. La

alimentación y suministro de agua de bebida fue ad libitum. Los comederos usados fueron tipo tolva y los bebederos tipo campana.

3.1.4 Vacunas

- Bursine II, clasificada como una cepa intermedia derivada de una cepa de campo, aplicada a los 7 días.
 - IBD blen, considerada como intermedia fuerte, aplicada a los 17 días de edad.
- Ambas a base de virus vivo modificado.

3.1.5 Materiales y equipos para evaluaciones de laboratorio y campo

Necropsias

Jabas para pollos

Bisturís

Equipo de disección

Índice bursal

Balanza digital con capacidad para 200 gr.

Balanza digital con capacidad para 5 Kg.

Fichas de registro

Calculadora.

Evaluación serológica

Kits de ELISA (IDEXX) para el VEIB.

Agujas hipodérmicas descartables N° 18 x 1 ½ pulgada.

Frascos de vidrio esterilizados con tapón de goma.

Evaluación histopatológica

Frascos de plástico

Solución de formol buferado al 10%

3.2 Métodos

Se comparó la efectividad de dos vías de aplicación de vacunas vivas contra la enfermedad de Gumboro, la vía aspersión y la vía agua de bebida, bajo condiciones de campo (crianza) y de laboratorio (desafío).

Para el estudio se usaron 4 galpones de una granja comercial de pollos de carne perteneciente a una integración avícola.

Las aves de dos galpones fueron vacunadas por la ruta aspersión y las de los otros dos galpones por agua de bebida.

Grupo A: 34 700 aves (Dos galpones) vacunadas contra la enfermedad de Gumboro a los 7 (Bursine 2) y 17 días de edad (IBD blen), ambas vacunas aplicadas por vía aspersión.

Grupo B: 34 700 aves (Dos galpones) vacunadas contra la enfermedad de Gumboro a los 7 (Bursine 2) y 17 días de edad (IBD blen), ambas vacunas aplicadas por vía oral.

A los 29 días de edad, 50 aves de cada tratamiento fueron trasladadas a la FMV-UNMSM para su desafío a los 30 días de edad.

3.2.1 Desafío

El desafío se realizó por la ruta ocular con la cepa estándar F52/70 proporcionada por la Dra. Jane Cook de los Laboratorios Intervet- Holanda.

3.2.2. Parámetros evaluados:

3.2.2.1 Evaluación de la Protección contra la enfermedad clínica posdesafío:

Mortalidad, signos clínicos

Posterior al desafío se realizó la observación clínica diaria de todas las aves en busca de depresión, diarrea y mortalidad, que fue la principal variable para evaluar la protección.

Lesiones e índice bursal

A los 3, 7 y 10 días posteriores al reto se realizó la necropsia a 10 aves por grupo con el fin de evaluar las lesiones macroscópicas y microscópicas de las bursas así como para el cálculo del Índice bursal.

Cuadro 1.- Número de aves desafiadas examinadas:

	Días posdesafío		
	3	7	10
Grupo A	10 aves	10 aves	10 aves
Grupo B	10 aves	10 aves	10 aves

Índice Bursal

Determina la relación peso bursa / peso corporal del ave, fue calculada siguiendo la fórmula de Giambrone, 1982.

$$I.B.= \frac{\text{PESO BURSA}}{\text{PESO CORPORAL}} \times 1000$$

Lesiones microscópicas

Las bursas de Fabricio fueron examinadas histológicamente para determinar grado de severidad de lesiones. Los exámenes histológicos se realizaron en el Laboratorio de Histopatología de la FMV-UNMSM. Se utilizó un puntaje del 1 al 4 para describir el grado de severidad de bursas (Mohamed, 1996) considerando:

- 1: Sin lesiones significativas en el tejido bursal
- 2: Leve depleción de células linfoides en pocos folículos (30%)
- 3: Moderada atrofia o depleción de células en un tercio o mitad de los folículos (31 – 75%)
- 4: Severa necrosis y atrofia o depleción en todos los folículos (> 75%)

Evaluación de la respuesta sexológica

A los 3, 7 y 10 días post reto se colectaron 16 muestras de sangre por grupo para la medición de anticuerpos contra el EIBV usando un kit comercial de ELISA de los laboratorios IDEXX.

3.2.2.2 Evaluación de la Protección en campo

Evaluación de lesiones macroscópicas y microscópicas en campo

A los 30, 33 y 37 días de edad se sacrificaron 20 aves por grupo para la evaluación del índice bursal, lesiones macroscópicas y microscópicas.

Cuadro 2.- Número de aves no desafiadas examinadas:

	Edad de las aves		
	30	33	37
Grupo A	20 aves	20 aves	20 aves
Grupo B	20 aves	20 aves	20 aves

Evaluación serológica en campo

Se colectaron 16 muestras de sangre por grupo a los 30, 33 y 37 días de edad para evaluación de la respuesta serológica a la vacunación contra la enfermedad de Gumboro de las aves no desafiadas, mediante la prueba de ELISA. Se utilizó un kit comercial de ELISA de los Laboratorios IDEXX.

3.2.3 Análisis Estadístico

Se examinaron las variables comparándolas entre ambos tratamientos.

Las principales variables para evaluar protección fueron signos clínicos y mortalidad en las aves desafiadas y se compararon por la prueba de χ^2 .

Los índices bursales y el nivel de anticuerpos se evaluaron con la prueba de T de Student independiente y las lesiones microscópicas con la prueba de KSII.

IV. RESULTADOS

4.1 Signos clínicos

Los animales desafiados presentaron depresión y diarrea a los 3, 4 y 5 días post desafío, estos resultados se observan en la figura 1 y 2, no encontrándose diferencia significativa respecto a diarrea para ningún día posdesafío ($Pr > 0.05$); contrariamente sí se observaron diferencias estadísticas para la variable depresión, determinándose que los animales vacunados vía agua de bebida tienen, a los 3, 4 y 5 días posdesafío 3.41, 6.67 y 7.91 veces más probabilidad de manifestar depresión que los animales vacunados vía aspersión según la prueba de Odds Ratio.

Figura 1.- Porcentaje de animales desafiados que presentaron depresión:

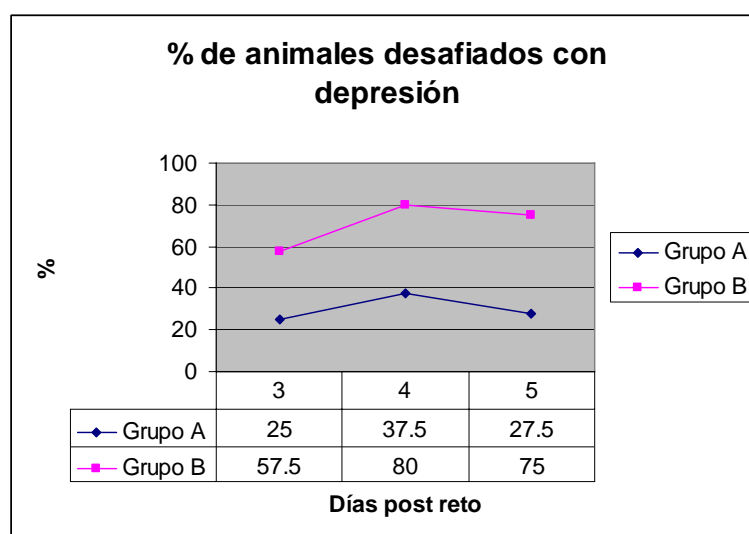
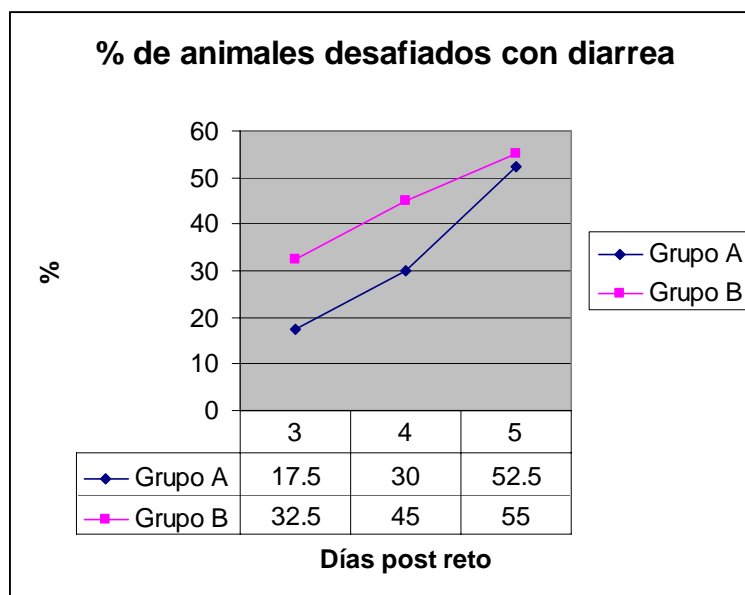


Figura 2.- Porcentaje de animales desafiados que presentaron diarrea:



4.2 Resultados de Índice Bursal

Según la clasificación de índice bursal elaborado por Giambrone (1982), en ambos grupos de aves no desafiadas se observó: atrofia bursal al día 30 y severa atrofia bursal a los 33 y 37 días de edad.

En los animales desafiados se observó similar grado de atrofia bursal que en los grupos no desafiados, a los tres, siete y diez días posdesafío.

Según la prueba de T de Student entre ambos grupos no se encontró diferencia estadística significativa en ninguno de los días en que se realizaron las necropsias, tanto en los animales no desafiados como desafiados.

Figura 3.- Índices bursales hallados en los animales no desafiados:

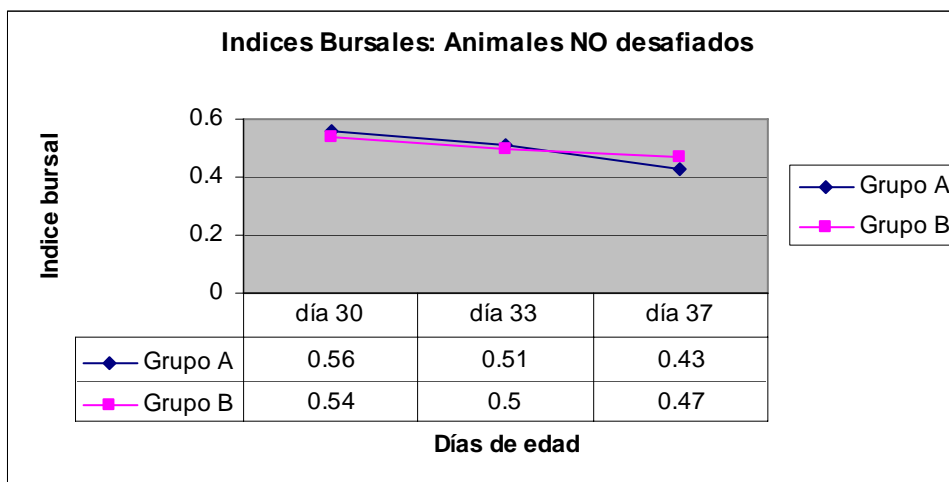
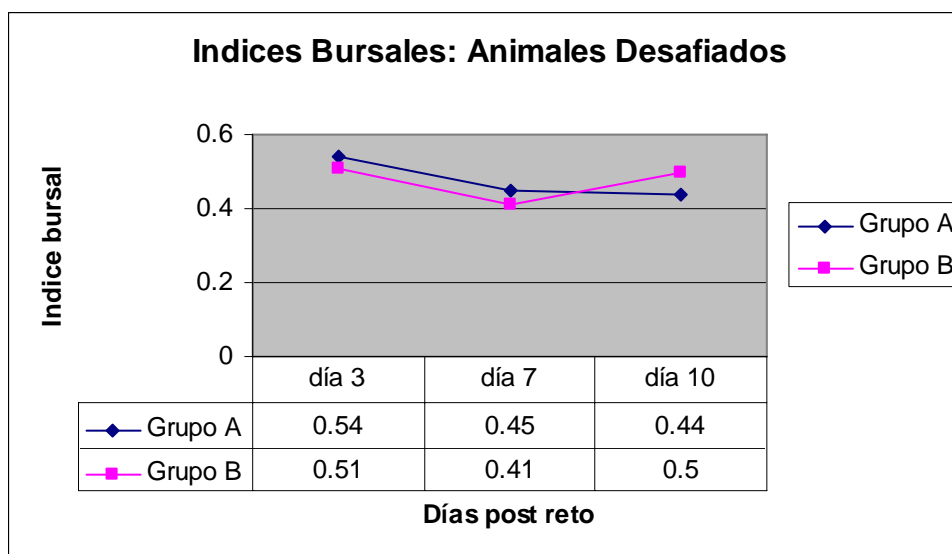


Figura 4.- Índices bursales hallados en los animales desafiados:



Calificación del índice bursal por Giambrone (1982)

1.5-3.5 = Bursa normal

0.5-1.5 = Atrofia bursal

≤ a 0.5 = Severa atrofia bursal

4.3 Evaluación de las lesiones microscópicas de la Bursa

Microscópicamente, se observó daño bursal en los dos grupos de animales tanto desafiados como no desafiados. Los grados promedios de lesión estuvieron entre 2 y 4, observándose mayor atrofia en las bursas provenientes de animales vacunados vía aspersión; sin embargo, según la prueba de KSII no se obtuvo diferencia estadística significativa entre ambos grupos.

Figura 5.- Grado de lesión microscópica en bursa de animales no desafiados:

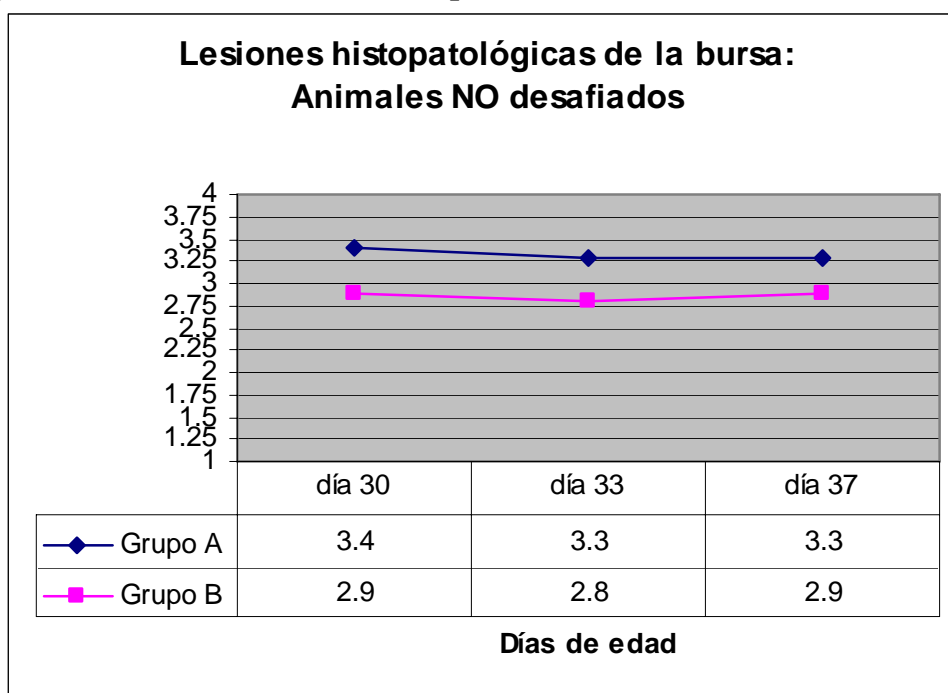
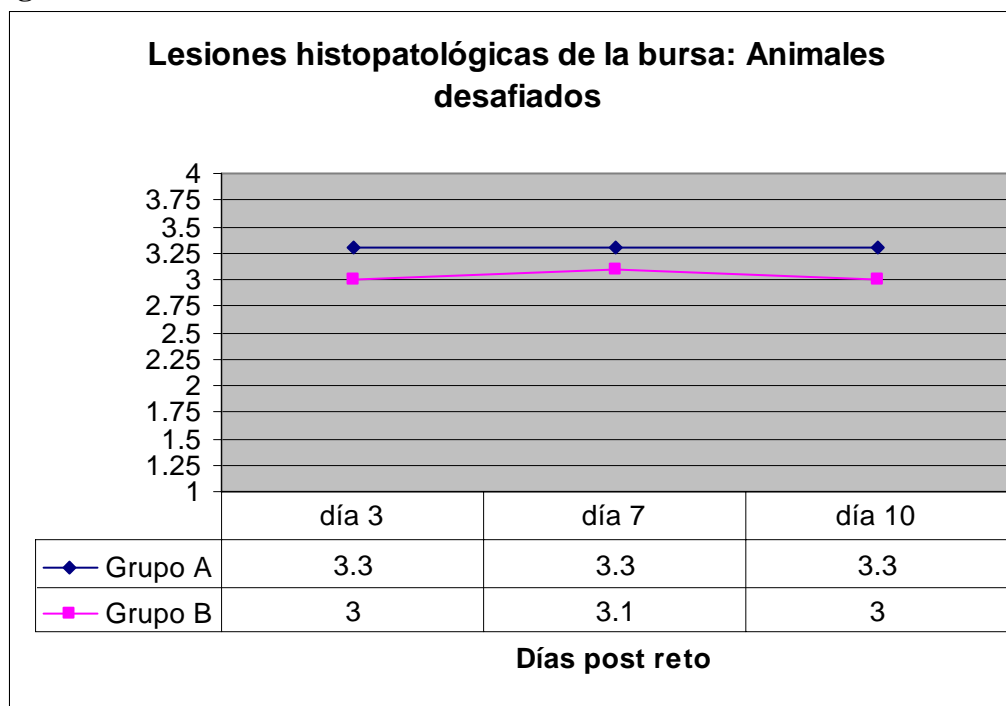


Figura 6.- Grado de lesión encontrado en la bursa de los animales desafiados:



Clasificación microscópica del grado de lesión bursal (Mohamed, 1996)

- 1: No hay lesiones significativas en el tejido bursal
- 2: Leve depleción de células linfoides en pocos folículos (30%)
- 3: Moderada atrofia o depleción de células en un tercio o mitad de los folículos (31 – 75%)
- 4: Severa necrosis y atrofia o depleción en todos los folículos (> 75%)

4.4 Serología

En las aves no desafiadas, se observó mejor nivel de respuesta inmune activa con la vacunación por la vía aspersión que por el agua de bebida. Contrariamente en los grupos desafiados se observó mayor elevación de títulos de anticuerpos posdesafío en los grupos vacunados vía agua de bebida que los vacunados vía aspersión. Sin embargo, no existieron diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos en ninguno de los días en los animales desafiados ni en los no desafiados.

Figura 7.- Serología de los animales no desafiados:

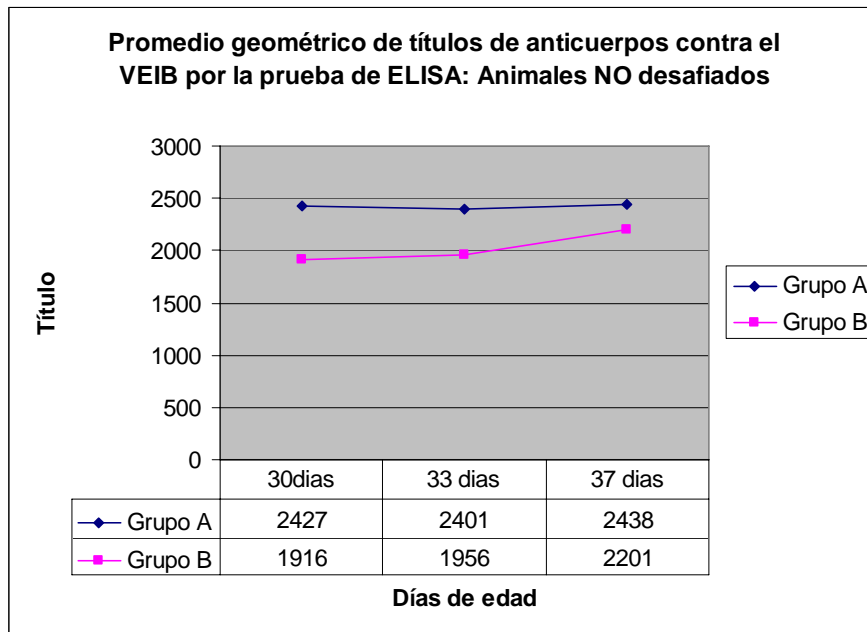
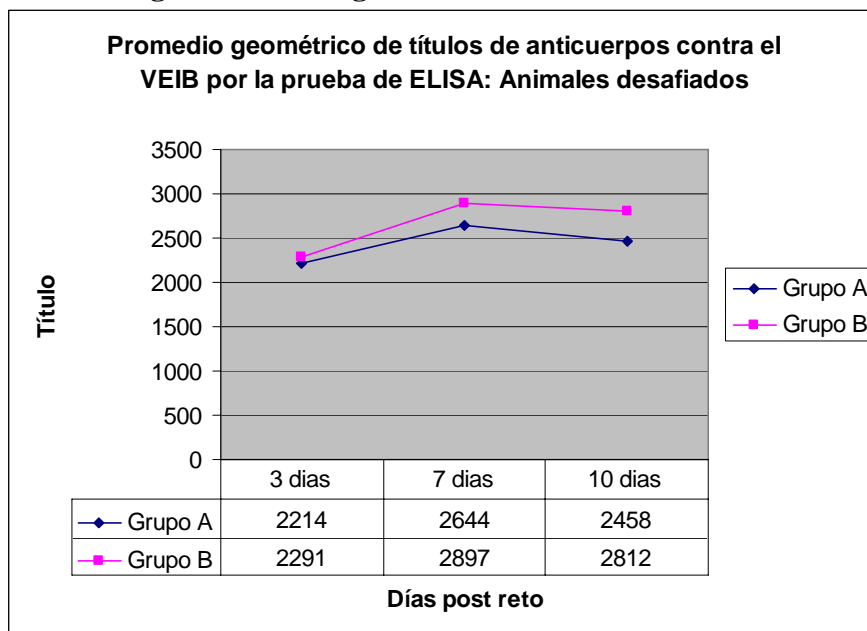


Figura 8.- Serología de los animales desafiados:



V. DISCUSION

La vacunación en pollos de carne contra la EIB es muy importante para la prevención de la enfermedad sin embargo, en el campo es difícil lograr una protección del 100% de las aves, porque algunas de las causas muy frecuentes son debidas al manejo de la vacuna en campo y a la administración masiva de la vacuna vía agua de bebida la cual en las mejores condiciones alcanza solamente al 80% de la aves (Giambrone, 1995; van der Wijngaard, 2001).

En el presente estudio se comparó la efectividad de dos vías de aplicación de vacunas vivas contra la enfermedad de Gumboro, la vía aspersión y la vía agua de bebida, para este objetivo la variable sintomatología clínica posdesafío fue lo más importante en la evaluación de la protección. Los dos grupos de aves presentaron depresión y diarrea posdesafío, sin embargo, estos signos clínicos fueron considerados leves, observándose sólo durante los 3 días siguientes al desafío, esto indicó la buena protección conferida contra la enfermedad clínica por ambas vías de aplicación. El grupo de aves vacunado vía agua de bebida mostró mayor porcentaje de aves con diarrea y depresión, sin embargo, para el signo de diarrea no se observaron diferencias estadísticas significativas en ninguno de los tres días posdesafío ($p>0.05$); para la presentación de depresión si se observó diferencias en los tres días posdesafío, demostrándose que a los tres días posdesafío la probabilidad de que los pollos vacunados vía agua presenten depresión es 3.41 veces mayor que en los pollos vacunados vía aspersión, de 6.67 a los cuatro días y de 7.91 a los cinco días posdesafío. Esto indicaría que ante un desafío de campo la población de aves vacunadas vía aspersión presentaría el mismo número de aves con diarrea y menor número de aves con depresión que las vacunadas vía agua de bebida. Probablemente, los animales tuvieron una buena integridad intestinal que no permitió el

desarrollo exagerado de la diarrea en ninguno de los tratamientos evaluados, sin embargo, para la variable depresión se demuestra que las aves vacunadas vía aerosol tuvieron mejor protección. Estas manifestaciones clínicas fueron pasajeras y de corta duración, el resto de aves que continuó su crianza en granja no mostraron ningún tipo de signos clínicos hasta la saca.

Al analizar los índices bursales en las aves sin desafiar que se mantuvieron en granja se observó atrofia bursal a los 30 días y severa atrofia bursal a los 33 y 37 días, según el parámetro establecido por Giambrone en 1982, sin embargo no existió diferencia estadística para la atrofia bursal entre los grupos en ninguno de los días evaluados. Las bursas de estos animales no mostraron lesiones en las necropsias, observándose integridad en la mucosa y los pliegues bursales. En cambio, los animales desafiados mostraron atrofia bursal a los 3 días posdesafío y severa atrofia bursal a los 7 y 10 días posdesafío y tampoco mostraron diferencias estadísticas entre el grupo vacunado vía aspersión y vía agua de bebida para ningún día posdesafío. Sin embargo, en el grupo de aves desafiadas se encontraron algunas lesiones macroscópicas bursales consistentes en ligeras hemorragias y edema, pero ninguna de estas lesiones fue marcada, demostrándose por una lado la actividad de la cepa de desafío y por otro la buena protección vacunal conferida por ambas vías de aplicación. Esto coincide con los resultados encontrados por Banda *et al* (2005) quienes no encontraron diferencias significativas en el índice bursal entre las aves vacunadas al día y a los 10 días de edad vía agua y vía aspersión; sin embargo, en los animales que fueron vacunados a los 5 y 14 días encontraron índices bursales mas altos para los animales vacunados vía aspersión que los vacunados vía agua. Esto coincidiría con la hipótesis que los animales vacunados vía aspersión tienen mejor o igual protección que los vacunados vía agua de bebida. En otro estudio Purvis *et al* en el 2005 encontraron las bursas de los animales vacunados vía aspersión menos atrofiadas que las de los animales sin vacunar. La atrofia bursal encontrada en nuestro estudio se debe a la replicación de los virus vacunales, lo cual confirmaría que la vacuna aplicada vía aspersión tiene buena replicación al igual que la aplicación vía agua de bebida.

El estudio histopatológico mostró lesiones microscópicas bursales en ambos grupos, tanto en animales desafiados como no desafiados, con grados de lesiones que variaron

entre la depleción de células linfoides en el 30% de folículos (grado 2) y la severa necrosis y atrofia o depleción en más del 75% de los folículos bursales (grado 4), estos resultados coinciden con la atrofia bursal y severa atrofia bursal encontrada en el examen macroscópico. Además, no se encontraron diferencias estadísticas entre las aves vacunadas vía aspersión y vía agua de bebida para ningún día de edad evaluada tanto en las aves no desafiadas como en las desafiadas. En el estudio desarrollado por Purvis *et al* (2005) se encontró que las aves vacunadas vía aspersión tuvieron valores de atrofia menores que las no vacunadas, similares resultados obtuvieron Giambrone y Clay (1986).

Banda *et al* (2005) encontraron que la vacunación vía aspersión produce menos atrofia que la vacuna vía agua de bebida lo que difiere de nuestro estudio ya que nosotros no encontramos diferencias significativas, sin embargo se coincide en que la vacunación contra la EIB vía aspersión produce similar o mejor protección que vía agua de bebida.

Los títulos de anticuerpos para los animales sin desafiar que se desarrollaron en campo no mostraron diferencias estadísticas significativas en ninguno de los días evaluados entre los animales vacunados vías aspersión y vía agua de bebida, además los coeficientes de variación oscilaron entre 21 y 36, lo cual indicó que la vacunación por ambas vías se realizó de manera adecuada y uniforme. El mismo perfil de respuesta serológica fue observado en los grupos de aves desafiadas, no encontrándose diferencia estadística significativa entre ambos grupos en ninguno de los días evaluados. Estos resultados no coinciden con la investigación realizadas por Banda *et al*, ya que ellos encontraron mejores niveles de anticuerpos con la prueba de ELISA en los animales vacunados vía agua de bebida, contrariamente en el estudio realizado en el 2001 por Emikne *et al* se encontraron mayores títulos de anticuerpos con la prueba de agar gel precipitación en todos los grupos vacunados por vía parenteral que en los animales vacunados vía agua de bebida. Sin embargo, pese a esta diferencia, en estos tres estudios incluyendo al nuestro, se encuentra mejores o iguales índices bursales macro y microscópicos y menor cantidad de signos clínicos en los animales vacunados vía aspersión comparando con las aves vacunadas vía agua de bebida.

En el estudio realizado por Emikpe (2001) se probó la vacunación de Gumboro a los 7 y 14 días mediante vías parenteral y oral, al analizar los índices bursales, la

histopatología de la bursa y la respuesta de anticuerpos se concluyó que la vacunación por la vía parenteral incrementa la protección contra la enfermedad de Gumboro en comparación con las vacuna por la vía oral.

Según los resultados obtenidos en la presente investigación, las aves que fueron vacunadas vía aspersión obtuvieron iguales índices bursales y lesiones histológicas que las aves vacunadas vía agua de bebida tanto en los grupos sin desafiar como desafiados. Los animales retados mostraron un comportamiento clínico similar posdesafío presentándose leve depresión y diarrea, sin embargo, la depresión se presentó con mayor frecuencia en las aves vacunadas vía agua de bebida. Todo esto demuestra que la vacunación vía aspersión contra la enfermedad infecciosa de la bursa protege igual o mejor a las aves que la vacunación vía agua de bebida. Se debe tener en cuenta que las condiciones experimentales del trabajo mejoraron la uniformidad de la vacunación vía agua lo que favorece la igualdad de resultados para ambos tratamientos, sin embargo, en condiciones de campo la vacunación vía oral puede resultar desuniforme debido a varios factores, por esta razón al no existir diferencias entre ambos tratamientos o existirlas a favor de la vacunación vía aspersión es recomendable aplicar las vacunas contra la EIB en campo por esta vía.

VI. CONCLUSIONES

1. La vacunación contra la enfermedad de Gumboro vía aspersión demostró similar o mejor protección contra la enfermedad clínica que la vacunación vía agua de bebida, al no observarse mortalidad, y tener menor porcentaje de depresión ($p>0.05$) después del desafío con la cepa F52/70.
2. La vacunación por ambas vías de aplicación indujo similar índice bursal, lesiones microscópicas, y respuesta serológica, demostrando igual infectividad de la cepa vacunal, concluyéndose que ambas vías pueden ser indistintamente utilizadas en la vacunación contra Gumboro.

VII LITERATURA CITADA

1. Al- Natour, M. Q; Ward, L. A; Saif, Y. M; Stewart-Brown, B. and Keck, L.D. 2004. Effect of Different Levels of Maternally Derived Antibodies on protection against Infectious Bursal Diseases Virus. Avian Dis. 18: 177- 182.
2. Aranda, A. 1995. En la frontera de la vida: los virus. 2da Ed. Editorial Fondo de cultura económica. México. pp viii.
3. Audhya, T; Kroon, D; Heavner, G; Viamontes, G and Goldstein, G. 1986. Tripeptide structure of bursin, a selective B-cell-differentiating hormone of the bursa of fabricius. Science. 231 (4741):997 – 999.
4. Avellaneda G.; P. Villegas. 1995. Enfermedad infecciosa de la bolsa. Avicultura profesional. 12 (4): 190-200. 13 (1):32.
5. Babaahmady, E; R. Joa; J. Noda. 2005. Enfermedad de Gumboro: histopatología de la Bursa de Fabricio en la enfermedad natural y experimental en pollos de engorde. Redvet. 6(3): 1-9.
6. Banda, A.; P. Villegas. 2002. Enfermedad infecciosa de la bolsa. Industria avícola. 49(7): 22-25.
7. Banda, A.; P. Villegas; F. Perozo. 2005. Evaluation of the protection conferred by coarse spray vaccination against infectious bursal disease in commercial broilers. Convention notes from the 142th. AVMA Annual Convention July 16-20. Minneapolis. pp:59.
8. Benton, W. J.; M. Cover; J. Rosenberger. 1967. Studies on the transmission of the infectious bursal agent (IBA) of chickens. Avian Dis. 11: 430-438.

9. Bernardino, A. 2004. Programas de vacinação. En Mendes, A.A.; I. de Alentar; M. Macari; Produção de Frangos de corte. The world's poultry science association Editorial Facta. Brasil.
10. Butcher G.; R. Miles. 1993. Prevención y control de Gumboro. Industria avícola. 40(7): 8-10.
11. Cardozo, B.; O. Morales. 2004. Enfermedad de Gumboro: el desafío de la vacunación. Mundo avícola y porcino. 50: 16-17.
12. Carter, G.R.; Wise D.J. 2005. A concise review of veterinary virology. International Veterinary Information Service. Last updated: 15-Aug-2005; A3417.0805.
13. Cosgrove, A. S., 1962: An apparently new disease of chickens- avian nephrosis. Avian Dis. 6: 385-389.
14. Coulibaly, F.; C. Chevalier; I Gutsche; J. Pous; J. Navaza; S. Bressanelli; B. Delmas y F. Rey. 2005. The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. Cell. 120: 761-772.
15. Cullen, G.A. 1982. The Bursa: Fabricius to Delaware. J R Soc Med. July; 75(7): 507-512.
16. De Witt, J.J. 2002. Enfermedad infecciosa de la bursa: determinación de la edad óptima de vacunación usando la formula Deventer. Idexx Laboratories. 2128-00 (9).
17. Di Fabio, J.; 2001. Diagnóstico sorológico da doença de gumboro. II simposio da doença de gumboro. 21-22 de novembro, Campinas – Brasil. pp. 79-91.

18. Di Fabio, J.; De Castro, G.; Gardin, Y.; Rossini, L.I.; Toquin, D y Eterradosi, N. 1999. La enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio (EIBF) por cepas de alta virulencia se propagan a Latinoamérica. *Avicultura profesional*. 17(9): 15-18.
19. Dohms J.; K. Lee; J. Rosemberg. 1988. Plasma cell changes in the gland of Harder following infectious bursal disease virus infection of the chicken. *Avian Dis*. 25(3):683-695.
20. Dormitorio T.V.; J.J. Giambrone y L. W. Duck. 1997. Sequence of the variable VP2 region of eight infectious bursal disease virus isolates. *Avian Dis*. 41: 36-4.
21. Dufour-Zabala, L; K. Rudd y J. Chapman. 1994. Control de la enfermedad infecciosa de la bolsa con programas de vacunación al día de edad y en el campo, empleando vacunas combinadas con las cepas clásicas y Delaware. Select laboratorios, Inc. Georgia Usa. pp 2-12.
22. Erf G. 1997. Immune system function and development in broilers. Forty sixth annual national breeders roundtable proceedings. pp. 109-123.
23. Emikpe, B. O.; Akpavie S.O.; Adene, D.F. 2001. Influence of parenteral route on oral route of local IBD vaccine administration in the responses of broiler chicks. *Rev. élev. méd. vét. pays. trop*. 54(4): 213-216.
24. Falcón, R. 1998. Brote de la enfermedad de Gumboro en aves de postura comercial. *Revista de Investigaciones Pecuarias. IVITA*. 9(1):81-84.
25. Giambrone, J.J. 1982. Control of Gumboro disease in chickens by vaccination. *Agriculture and natural resources*. 7(1): 1-2.
26. Giambrone, J.J. 1995. Broiler vaccination-additional protection is often needed. Summit on infectious bursal disease. International poultry symposium. April 3-4, Georgia. pp. 17-20.

27. Giambrone, J.J. and R.P. Clay. 1986 Efficacy of coarse spray administration of commercial intermediate infectious bursal disease vaccines. *Poultry Sci.* 65:807-809.
28. Huapaya, J. 1994. Evolución de la bursa de fabricio en pollos broilers: estudio anatómico patológico. Tesis para optar el título de médico veterinario. Fac. Med. Vet. UNMSM. Lima – Perú.
29. Hudson P. J.; N.M. McKern; B. E. Power y A. Azad. 1986. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic acids research.* 14(12): 5001-5009.
30. ICTVdB management. 2006. Avibirnavirus. In: ICTVdB – The universal virus data base, version 4. Columbia University; New York. 00.009.0.02.
31. In – Jeong, K.; Y. Seung Kwon; K. Hyungee; Y. Hung-Yeuh and J. Sharma. 2000. Characteristics of bursal T lymphocytes induced by infectious bursal disease virus. Department of veterinary pathobiology and department of animal science.
32. Jackwood, D. 2002. Enfermedad infecciosa de la bolsa: Situación mundial. X Seminario internacional de patología y producción aviar. Universidad de Georgia 27 – 31 mayo. pp 1 – 6.
33. Jackwood, D. J. 1999. Biotecnología de la infección bursal. XVI congreso latinoamericano de avicultura. 21-24 septiembre. Lima. pp 31 – 32.
34. Kaufer, I. and E. Weiss. 1980. Significance of bursa of fabricius as target organ in infectious bursal disease in chickens. *Infect Immun.* 27(2): 364–367.
35. Landgraf, H.; E. Vielitz and R. Kirsch. 1967. Untersuchungen über das auftreten einer infektiösen erkrankung mit der Bursa Fabricii. *Deutscher Tierärztliches Wochenschrift*, 74, 6–10.

36. Lasher, H. N. and Shane, S.M.; 1994. Infectious bursal disease. World's poultry science – Journal. 50 (2): 133-158.
37. Lombardo, E; Maraver A.; Espinosa, I.; Fernandez-Arias, A. and Rodriguez J.F. 2000. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. Virology. 277(2):345-57.
38. Lindahl, J. 2004. Infectious bronchitis virus and infectious bursal disease virus; a study performed at the Universidad Nacional of Costa Rica. pp. 17-30.
39. Lonneke, V. and T.F. Davison. 1997. Comparison of the in situ changes in lymphoid cells during infection with infectious bursal disease virus in chickens of different ages. Avian Pathology 26: 803-821.
40. Lucio, B. 1995. Enfermedades infecciosas inmunosupresoras. IV congreso nacional de avicultura. Asociación nacional de avicultura. APA. 8-11 diciembre Trujillo Perú. pp. 47 - 60.
41. Lukert, P. D.; 1994. Use of live infectious bursal disease vaccines in the presence of maternal antibody. World poultry – Misset supplement, December: 4-7.
42. Lukert, P.; V. Saif. 2003. Infectious bursal disease. In: Calnek, B. and H. Barnes. Disease of poultry eleven edition. U.S.A. pp 161-174.
43. Lukert, P.D.; 1995. Infectious bursal disease: past, present and future. Summit on infectious bursal disease. International poultry symposium. April 3-4, Georgia. pp. 17-20.
44. Malliga, M and F. Kibenge. 1997. Infectious bursal disease virus: a review of molecular basis for variations in antigenicity and virulence. Can J Vet Res. 61: 81-88.

45. Mandeville, W. F.; F. K. Cook and D. J. Jackwood. 2000. Heat lability of five strains of Infectious Bursal Disease Virus. *Poultry Sci.* 79:838-842.
46. Mc Murray B. L. 1995. Summit on infectious bursal disease. International poultry symposium. April 3-4, Georgia. pp.35 – 39.
47. Mohamed, K.; M. Al Natour; L. Ward and Y. Saif. 1996. Pathogenicity, attenuation, and immunogenicity of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 40:567-571.
48. Montassier, H. 2001. Doença de gumboro: imunologia. II simposio da doença de gumboro. 21-22 de novembro, Campinas – Brasil. pp. 79-91.
49. Morales, C. 1998. Análisis matemático histopatológico de bursas en pollos broilers. I congreso virtual veterinario de diagnóstico por imágenes.
50. Muller, M and H. Becht. 1982. Biosynthesis of virus specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. *Journal of virology.* 44(1): 384 – 392.
51. Mundt, E.; Beyer, J. and Muller, M. 1995. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J Gen Virol.* 76(2): 437-443.
52. Odor, E.M. 1995. ELISA Serology: Application to infectious bursal disease in broiler production. Summit on infectious bursal disease. International poultry symposium. April 3-4, Georgia. pp. 17-20.
53. OIE. 2007. World Animal Health Information Database (WAHID) - Version: 1.0. Release date:2 August 2007.

54. Piña, E. 2003. vvIBDV ahora en Venezuela: país tras país, el virus hipervirulento de Gumboro esta invadiendo el continente americano. *Avicultura profesional*. 21(1): 24-27.
55. Pope, C.R. 1996. Lymphoid system. *Avian Histopathology*. AAAP. pp 17 – 35.
56. Purvis, L.; P. Villegas; A. Banda. 2005. Comparison of two spray vaccination methods against infection bursal disease virus in broilers. *Convention notes from the 142th AVMA Annual Convention July 16-20. Minneapolis*. pp.70.
57. Rosales, G. 1993. Aspectos de campo en el control de la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio en reproductoras y pollos de engorde. III congreso nacional de avicultura. APA 8-11 diciembre, Trujillo Perú. pp. 67-69.
58. Rosales, G. 1997. Control de la infección de la bolsa de Fabricio. *Acontecer avícola*. Ene – Feb. 5 (22): 27-31.
59. Ruocco, T.C. 2001. Doença de gumboro: imunologia. II simposio da doença de gumboro. 21-22 de novembro, Campinas – Brasil. pp. 47-52.
60. Russell, I.D. 1992. Medicación adecuada de agua con buenos sistemas de bebederos. *Industria avícola*. 38(10):8.
61. Saif, Y.M. 1999. Control y prevención de la enfermedad infecciosa de la bursa. XVI congreso latinoamericano de avicultura. 21-24 setiembre. Lima. pp 37 - 38.
62. Saif, Y.M. 2003. Vacunas y vacunación contra la enfermedad de gumboro. *Mundo avícola y porcino*. 43: 7-8.
63. Salas, M.; E. Icochea y C. Gavidia. 2002. Comparación de una prueba de ELISA estándar y ELISA de rango extendido para la enfermedad infecciosa de la bursa en aves. *Rev. Inv. Vet. Perú*; 13(1):67 - 71

64. Sharma, J.M. 2006. Mechanisms of infectious bursal disease virus-induced immunosuppression. Impact of subclinical immunosuppression on poultry production. American association of avian pathologists. July. pp. 25-26.
65. Sharma, J.M.; 1995. Effect of infectious bursal disease on the immune system. Summit on infectious bursal disease. International poultry symposium. April 3-4, Georgia. pp. 17-20.
66. Stewart-Brown B. 1990. Un enfoque integral de la enfermedad infecciosa de la bursa. Industria avícola. 37(7): 6-12.
67. Talavera, B. 1994. Reconocimiento de las lesiones macroscópicas y microscópicas de los órganos linfoides de aves con inmunosupresión. Tesis para optar el título de médico veterinario. Fac. Med. Vet. UNMSM. Lima – Perú.
68. Tizard, I. 1995. Inmunología veterinaria. 4ta edición. Edit. Interamericana S.A. México D.F.
69. Van den Berg, T.; Eterradosi, N. 2001. Doença infecciosa bursal aguda em aves. II simposio da doença de Gumboro. 21-22 de novembro, Campinas – Brasil. pp. 103-123.
70. Van den Berg, T.; M. Gonze and G. Meulemans. 1991. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. Avian pathology 20: 133-143.
71. Van den Wijngaard, J.K. Avakian, A. 2001. La vacunación In Ovo contra la EIB sobrepasa el enfoque convencional. World Poultry. Elsevier special. pp 13 - 15
72. Vargas, J. 1989. Tres enfermedades se llevan los aplausos. Industria avícola. 36(12):10 – 11.

VIII. APÉNDICES

Apéndice 1.-Signos clínicos de animales desafiados

Días post reto	Diarrea % (n)		Depresión % (n)	
	Grupo A (agua)	Grupo B(Spray)	Grupo A (agua)	Grupo B(Spray)
3	32.5 (13 pollos)	17.5 (7 pollos)	57.5(23 pollos)	25 (10 pollos)
4	45 (18 pollos)	30 (12 pollos)	80(32 pollos)	37.5 (15 pollos)
5	55(22 pollos)	52.5 (21 pollos)	75 (30 pollos)	27.5(11 pollos)

Apéndice 2.- Análisis estadístico de los signos clínicos mediante la prueba de Chi cuadrado para depresión - 3 días posdesafío:

	Grupo		Total
	A	B	
Sin depresión	40	27	67
	59.70%	40.30%	100%
Con depresión	10	23	33
	30.30%	69.70%	100%
Total	50	50	100

Pearson χ^2 (1) = 7.6436 Pr = 0.006

Regresión logística:

Depresión	Odds Ratio	Error estandar	Z	P> z	[95%-Conf. Interval]	
Grupo	3.407407	1.544707	2.70	0.007	1.401336	8.285256

Apéndice 3.- Análisis estadístico de los signos clínicos mediante la prueba de Chi cuadrado para depresión – 4 días posdesafío:

	Grupo		Total
	A	B	
Sin depresión	25	8	33
	75.76%	24.24%	100%
Con depresión	15	32	47
	31.91%	68.09%	100%
Total	40	40	80

Pearson $\chi^2 = 14.9065$ Pr = 0.000

Regresión logística:

Depresión	Odds Ratio	Error estandar	Z	P> z	[95%-Conf. Interval]	
Grupo	6.666667	3.418352	3.70	0.000	2.440354	18.2123

Apéndice 4.- Análisis estadístico de los signos clínicos mediante la prueba de Chi cuadrado para depresión – 5 días posdesafío:

	Grupo		Total
	A	B	
Sin depresión	29	10	39
	74.36%	25.64%	100%
Con depresión	11	30	41
	26.83%	73.17%	100%
Total	40	40	80

Pearson $\chi^2 (1) = 18.0613$ Pr = 0.000

Regresión logística:

Depresión	Odds Ratio	Error estandar	Z	P> z	[95%-Conf. Interval]	
Grupo	7.909091	4.022961	4.07	0.000	2.91852	21.43337

Apéndice 5.- Análisis estadístico de los signos clínicos mediante la prueba de Chi cuadrado para diarrea – 3 días posdesafío:

	Grupo		Total
	A	B	
Sin diarrea	43	37	80
	53.75%	46.25%	100%
Con diarrea	7	13	20
	35%	65%	100%
Total	50	50	100

Pearson χ^2 (1) = 2.2500 Pr = 0.134

Apéndice 6.- Análisis estadístico de los signos clínicos mediante la prueba de Chi cuadrado para diarrea – 4 días posdesafío:

	Grupo		Total
	A	B	
Sin diarrea	28	22	50
	56%	44%	100%
Con diarrea	12	18	30
	40%	60%	100%
Total	40	40	100

Pearson χ^2 (1) = 1.9200 Pr = 0.166

Apéndice 7.- Análisis estadístico de los signos clínicos mediante la prueba de Chi cuadrado para diarrea – 5 días posdesafío:

	Grupo		Total
	A	B	
Sin diarrea	19	18	37
	51.35%	48.65%	100%
Con diarrea	21	22	43
	48.84%	51.16%	100%
Total	40	40	100
Pearson χ^2 (1) = 0.0503 Pr = 0.823			

Apéndice 8.- Índices bursales en los animales no desafiados

	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B
	Día 30		Día 33		Día 37	
1	0.6716	0.3937	0.6201	0.5464	0.5128	0.5506
2	0.5217	0.5362	0.6686	0.4545	0.6289	0.6098
3	0.4444	0.4476	0.6818	0.4611	0.4823	0.6132
4	0.6747	0.4505	0.3255	0.4861	0.4287	0.5556
5	0.6441	0.3634	0.6729	0.5556	0.5676	0.402
6	0.6494	0.5658	0.3922	0.5044	0.3517	0.5367
7	0.5646	0.5469	0.4082	0.5006	0.407	0.547
8	0.4894	0.5626	0.5428	0.486	0.2503	0.7786
9	0.5993	0.5795	0.5195	0.5394	0.3941	0.5889
10	0.625	0.6192	0.5794	0.5718	0.4284	0.4908
11	0.5111	0.6329	0.3831	0.748	0.5441	0.3695
12	0.6192	0.4983	0.5929	0.4283	0.4018	0.3165
13	0.4032	0.6567	0.4775	0.3189	0.3867	0.3885
14	0.4566	0.5109	0.4756	0.565	0.4945	0.3723
15	0.4521	0.4367	0.5848	0.5783	0.3955	0.4957
16	0.5997	0.5564	0.3363	0.4065	0.3843	0.4237
17	0.4685	0.5636	0.4615	0.4848	0.3182	0.3188
18	0.5731	0.7157	0.5792	0.3822	0.3196	0.3817
19	0.5178	0.5199	0.4464	0.4132	0.4682	0.3006
20	0.6299	0.7335	0.4043	0.5229	0.411	0.3756
Promedio	0.55577	0.54445	0.50763	0.4977	0.428785	0.4708

Apéndice 9.- Índices bursales en los animales desafiados

	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B
	Día 33		Día 37		Día 40	
1	0.7163	0.4839	0.4983	0.4444	0.5405	0.7902
2	0.5682	0.3434	0.5641	0.3763	0.2714	0.3759
3	0.4418	0.6954	0.3279	0.4762	0.5689	0.5814
4	0.5754	0.5487	0.3883	0.2222	0.4327	0.3774
5	0.4959	0.466	0.3125	0.2801	0.2982	0.443
6	0.4294	0.4839	0.5882	0.4365	0.3743	0.3571
7	0.7264	0.8462	0.396	0.5195	0.3419	0.5459
8	0.7558	0.5303	0.5168	0.3415	0.5967	0.4792
9	0.4412	0.4364	0.4658	0.37	0.6778	0.447
10	0.2732	0.3125	0.4561	0.6329	0.2811	0.6303
Promedio	0.54236	0.51467	0.4514	0.40996	0.43835	0.50274

Apéndice 10.- Análisis estadístico de los índices bursales mediante la prueba de T de student – animales no desafiados 30 días de edad:

Grupo	Obs.	Promedio	Error estándar	Desviación estándar	[95% - Intervalo conf.]	
A	20	.55577	.0188851	.0844568	.516243	.595297
B	20	.5445	.0219362	.0981015	.4985871	.5904129
Combinados	40	.550135	.0143145	.0905327	.5211813	.5790887
Diferencia		.01127	.0289455		-.0473271	.0698671

$P > |t| = 0.6992$

Apéndice 11.- Análisis estadístico de los índices bursales mediante la prueba de T de student – animales no desafiados 33 días de edad:

Grupo	Obs.	Promedio	Error estándar	Desviación estándar	[95% - Intervalo conf.]	
A	20	.50763	.0251741	.1125819	.4549401	.5603199
B	20	.4977	.0202968	.0907702	.4552182	.5401818
Combinados	40	.502665	.0159798	.1010649	.4703429	.5349871
Diferencia		.00993	.0323372		-.0555332	.0753933

$P > |t| = 0.7605$

Apéndice 12.- Análisis estadístico de los índices bursales mediante la prueba de T de student – animales no desafiados 37 días de edad:

Grupo	Obs.	Promedio	Error estándar.	Desviación estándar	[95% - Intervalo conf.]	
A	20	.428785	.0203869	.0911728	.3861148	.4714552
B	20	.470805	.0280782	.1255696	.4120366	.5295734
Combinados	40	.449795	.0174529	.1103817	.4144932	.4850968
Diferencia		-.04202	.0346989		-.1122642	.0282242

$P > |t| = 0.2334$

Apéndice 13.- Análisis estadístico de los índices bursales mediante la prueba de T de student – animales desafiados 3 días posdesafío:

Grupo	Obs.	Promedio	Error estándar	Desviación estándar	[95% - Intervalo conf.]	
A	10	.54236	.0493461	.156046	.4307314	.6539886
B	10	.51467	.0499525	.1579636	.4016697	.6276703
Combinados	20	.528515	.0343189	.1534788	.4566847	.6003453
Diferencia		.02769	.070216		-.1198283	.1752083
P > t = 0.6980						

Apéndice 14.- Análisis estadístico de los índices bursales mediante la prueba de T de student – animales desafiados 7 días posdesafío:

Grupo	Obs.	Promedio	Error estándar	Desviación estándar	[95% - Intervalo conf.]	
A	10	.4514	.0297616	.0941146	.3840745	.5187255
B	10	.40996	.0376406	.1190301	.324811	.495109
Combinados	20	.43068	.0238315	.1065778	.3808	.48056
Diferencia		.04144	.0479851		-.059373	.142253
P > t = 0.3992						

**Apéndice 15.- Análisis estadístico de los índices bursales mediante la prueba de T
de student – animales desafiados 10 días posdesafío:**

Grupo	Obs.	Promedio	Error estándar	Desviación estándar	[95% - Intervalo conf.]	
A	10	.43835	.0466152	.1474101	.3328991	.5438009
B	10	.50274	.0431012	.1362981	.4052382	.6002417
Combinados	20	.470545	.0317678	.1420698	.4040543	.5370357
Diferencia		-.06439	.0634877		-.1977728	.0689928
P > t = 0.3239						

Apéndice 16.- Lesiones histopatológicas de la bursa - Animales no desafiados

	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B
	Día 30		Día 33		Día 37	
1	3	3	3	2	2	2
2	3	3	3	2	2	3
3	3	3	3	2	3	3
4	3	3	3	2	3	3
5	3	3	4	1	3	3
6	3	2	3	3	4	3
7	4	3	3	4	4	3
8	4	3	3	4	4	3
9	4	3	4	4	4	3
10	4	3	4	4	4	3
Promedio	3.4	2.9	3.3	2.8	3.3	2.9

Apéndice 17.- Lesiones histopatológicas de la bursa - Animales desafiados

	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B
	Día 33		Día 37		Día 40	
1	2	2	2	2	3	2
2	3	2	2	2	3	2
3	3	2	3	2	3	3
4	3	2	3	3	3	3
5	3	3	3	3	3	3
6	3	3	4	3	3	3
7	4	4	4	4	3	3
8	4	4	4	4	4	3
9	4	4	4	4	4	4
10	4	4	4	4	4	4
Promedio	3.3	3	3.3	3.1	3.3	3

Apéndice 18.- Análisis estadístico de las lesiones histopatológicas mediante la prueba de KS-II - Animales no desafiados 30 días de edad:

Grupo	D	Valor P	Corregido
A	0.0000	1.000	
B	-0.4000	0.202	
K-S combinado	0.4000	0.400	0.294

Apéndice 19.- Análisis estadístico de las lesiones histopatológicas mediante la prueba de KS-II - Animales no desafiados 33 días de edad:

Grupo	D	Valor P	Corregido
A	0.1000	0.905	
B	-0.5000	0.082	
K-S combinado	0.5000	0.164	0.102

Apéndice 20.- Análisis estadístico de las lesiones histopatológicas mediante la prueba de KS-II - Animales no desafiados 37 días de edad:

Grupo	D	Valor P	Corregido
A	0.0000	0.905	
B	-0.5000	0.082	
K-S combinado	0.5000	0.164	0.102

Apéndice 21.- Análisis estadístico de las lesiones histopatológicas mediante la prueba de KS-II - Animales desafiados 3 días posdesafío:

Grupo	D	Valor P	Corregido
A	0.0000	1.000	
B	-0.3000	0.407	
K-S combinado	0.3000	0.759	0.660

Apéndice 22.- Análisis estadístico de las lesiones histopatológicas mediante la prueba de KS-II - Animales desafiados 7 días posdesafío:

Grupo	D	Valor P	Corregido
A	0.0000	1.000	
B	-0.1000	0.905	
K-S combinado	0.1000	1.000	1.000

Apéndice 23.- Análisis estadístico de las lesiones histopatológicas mediante la prueba de KS-II - Animales desafiados 10 días posdesafío:

Grupo	D	Valor P	Corregido
A	0.0000	1.000	
B	-0.2000	0.670	
K-S combinado	0.2000	0.988	0.976

**Apéndice 24.- Títulos de anticuerpos según la prueba de ELISA - Animales no
desafiados:**

	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B
	Día 30		Día 33		Día 37	
1	2547	915	3899	1976	1963	2023
2	1789	1914	2789	3216	2396	2866
3	3530	987	1358	999	2141	2426
4	3347	1444	1408	1752	4400	1772
5	3676	1580	2828	2253	2881	1268
6	3427	1567	2828	1517	2668	2698
7	3165	548	2597	1382	2955	2911
8	3152	1456	1370	1988	1353	1845
9	1838	4232	3689	4553	4861	1599
10	1677	3386	1740	2622	1657	1584
11	2328	3915	764	1728	1282	1657
12	1358	2957	3440	3075	2052	4479
13	2519	2610	2381	1201	3093	1963
14	1541	3663	3962	1752	2850	2486
15	2102	2648	3093	1408	2471	1993
16	2686	1604	4198	2341	2471	3634
Promedio	2427	1916	2401	1956	2438	2201

**Apéndice 25.- Títulos de anticuerpos según la prueba de ELISA - Animales
desafiados:**

	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B
	Día 33		Día 37		Día 40	
1	3954	1826	2201	3170	2381	1225
2	2585	1166	2171	2835	2516	3062
3	2777	1529	3634	5547	2216	2924
4	3795	5596	2850	2231	3556	4072
5	2216	3915	5486	4305	1425	3915
6	1926	3624	1643	3618	1699	1541
7	2840	3860	2532	6114	4749	2789
8	2519	1370	3001	5596	2486	1993
9	2996	2506	4448	4877	4153	2713
10	2919	1914	999	2441	2306	4213
11	1529	800	2456	2532	2201	2820
12	2610	2278	1454	3806	3409	3556
13	2065	3821	1742	1512	2861	7786
14	976	2698	4337	1672	1821	3062
15	764	2025	1584	709	1601	3308
16	1889	2303	8900	2023	2201	1126
Promedio	2214	2291	2645	2897	2458	2812

Apéndice 26.- Análisis estadístico de los anticuerpos según la prueba de ELISA mediante la prueba de KS-II - Animales no desafiados 30 días de edad:

Grupo	D	Valor P	Corregido
A	0.1250	0.779	
B	-0.3750	0.105	
K-S combinado	0.3750	0.211	0.139

Apéndice 27.- Análisis estadístico de los anticuerpos según la prueba de ELISA mediante la prueba de KS-II - Animales no desafiados 33 días de edad:

Grupo	D	Valor P	Corregido
A	0.0625	0.939	
B	-0.4375	0.047	
K-S combinado	0.4375	0.094	0.055

Apéndice 28.- Análisis estadístico de los anticuerpos según la prueba de ELISA mediante la prueba de KS-II - Animales no desafiados 37 días de edad:

Grupo	D	Valor P	Corregido
A	0.0625	0.939	
B	-0.3125	0.210	
K-S combinado	0.3125	0.415	0.310

**Apéndice 29.- Análisis estadístico de los anticuerpos según la prueba de ELISA
mediante la prueba de KS-II - Animales desafiados 3 días posdesafío:**

Grupo	D	Valor P	Corregido
A	0.1875	0.570	
B	-0.1875	0.570	
K-S combinado	0.1875	0.941	0.900

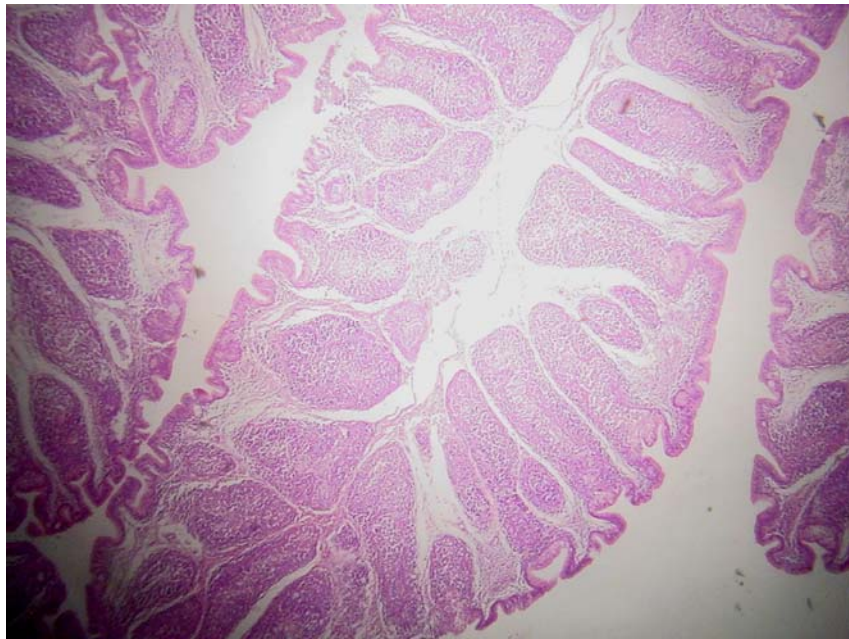
**Apéndice 30.- Análisis estadístico de los anticuerpos según la prueba de ELISA
mediante la prueba de KS-II - Animales desafiados 7 días posdesafío:**

Grupo	D	Valor P	Corregido
A	0.1875	0.570	
B	-0.0625	0.939	
K-S combinado	0.1875	0.941	0.900

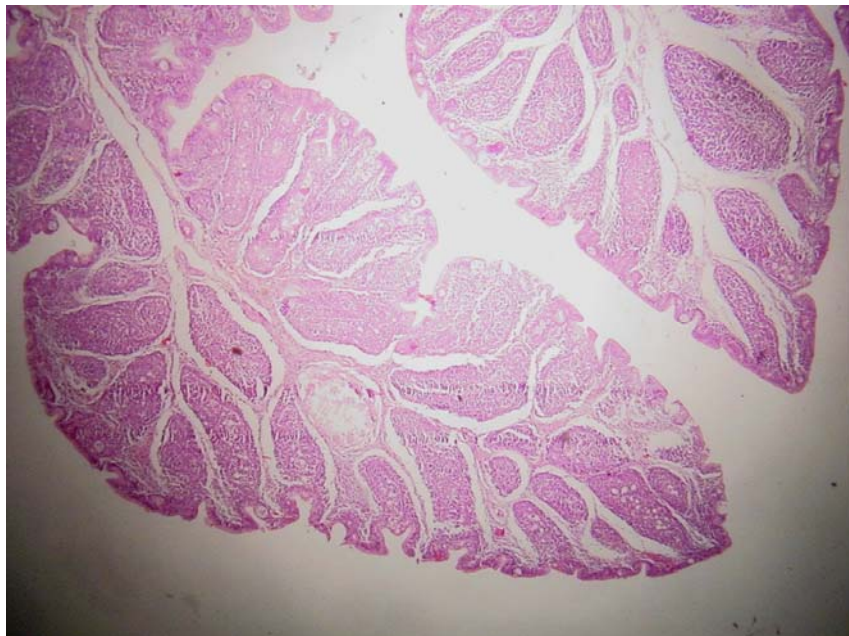
**Apéndice 31.- Análisis estadístico de los anticuerpos según la prueba de ELISA
mediante la prueba de KS-II - Animales desafiados 10 días posdesafío:**

Grupo	D	Valor P	Corregido
A	0.4375	0.047	
B	-0.1250	0.779	
K-S combinado	0.4375	0.094	0.055

Apéndice 32.- Microfotografía de la bursa, grado de lesión N°2: Leve depleción de células linfoides en pocos folículos (30%). Coloración HE, vista a 10X.



Apéndice 33.- Microfotografía de la bursa, grado de lesión N°3: Se observa moderada atrofia o depleción de células en un tercio o mitad de los folículos (31 – 75%). Coloración HE, vista a 10X.



Apéndice 34.- Microfotografía de la bursa, grado de lesión N°4: Severa necrosis y atrofia en todos los folículos (> 75%). Coloración HE, vista a 10X.

